

**Entwicklung einer Screeningmethode zum Nachweis
von Fruchtsaftverfälschungen mittels Fruchtsäure-
Aminosäure-Fingerprints durch Gaschromatographie-
Massenspektrometrie am Beispiel von Apfelsaft**

Vorgelegt von

Dipl.-Lebensmittelchemikerin

Antje Töpfer

Fachbereich 15

-Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie-

der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades

„Doktorin der Naturwissenschaften“

-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation

Berlin 1999

D83 / FB 15

Nr. 154

Promotionsauschuß

Vorsitzender: Prof. Dr. K. Krenkel

Berichter: Prof. Dr. H.-J. Stan

Berichter: Prof. Dr. K. Rubach

Tag der mündlichen Aussprache: 05.10.1999

Abstract

Es wird eine neue in-situ Derivatisierung mit anschließender Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC-MS) beschrieben. Mit Hilfe dieser Analysenmethode ist es erstmals möglich, 33 verschiedene Frucht- und Aminosäuren in einer einzigen Bestimmung zu erfassen. Dabei werden verschiedene Substanzklassen wie Dicarbonsäuren, Hydroxycarbonsäuren, aromatische Säuren und Aminosäuren gleichzeitig bestimmt.

In nur wenigen Minuten werden die verschiedenen Analyten ohne aufwendige Probenvorbereitung direkt im Fruchtsaft umgesetzt und der anschließenden gaschromatographischen Analyse zugänglich gemacht. Dabei werden Fingerprints erzeugt, die aufgrund des Substanzspektrums für die untersuchten Fruchtarten charakteristisch und aussagekräftig sind.

Am Beispiel des Apfelsaftes wird eine rechnergestützte Auswertung des Fingerprints erarbeitet und der „Apfelsaftfilter“ entwickelt. Mit Hilfe dieses Filters ist der Analytiker in der Lage authentischen Apfelsaft oder Verfälschungen über das dem Filter zugrunde liegende Muster zu erkennen.

Durch Untersuchungen anderer, dem Apfelsaft ähnlichen, Säfte, von Mischungen mit Birnensaft und von Blindproben wird der „Apfelsaftfilter“ getestet. Mit Hilfe dieser Testreihen wird gezeigt, daß die Kriterien des Filters hinreichend genau sind, um einen sehr geringen Anteil von Birnensaft zu erkennen und alle Blindproben richtig zu beurteilen.

Trotz nachweisbarer natürlicher Schwankungen der einzelnen Analyten gelingt es in dieser Arbeit durch die rechnergestützte Auswertung der typischen Fruchtsäure-Aminosäure-Muster im Fingerprint von Apfelsaft zu erkennen, ob reiner oder verdorbener Apfelsaft vorliegt, Citronensäure zugesetzt oder mit artfremden Säften verfälscht wurde.

Ein Screeningverfahren wird vorgestellt, das auf der neuen in-situ Derivatisierung mit anschließender GC-MS und der Auswertung mit dem Apfelsaftfilter aufbaut. Mit diesem Screening ist der Analytiker in der Lage, schnell und ohne großen Aufwand Apfelsaft zu identifizieren und auf verdächtige Proben hinzuweisen, die dann weiterführenden Analysen zugeführt werden müssen.

Danksagung

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden in der Zeit von Januar 1997 bis Januar 1999 am Institut für Lebensmittelchemie der TU Berlin durchgeführt.

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. rer. nat. Hans-Jürgen Stan, danke ich herzlich für die Betreuung der Arbeit, die stets vorhandene Bereitschaft zur Diskussion und die wertvollen Anregungen.

Mein Dank gilt aber auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises für ihre praktische Hilfe und fachliche Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Corinna Asmussen und Christian Böhme für ihre freundliche, aufmunternde und konstruktive Unterstützung. Sie haben mir auch in schwierigen Zeitabschnitten dieser Arbeit sehr geholfen.

Ein herzlicher Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium ermöglichten und stets Interesse für meine Arbeit und damit verbundene Probleme zeigten.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Allgemeine Grundlagen - Ausgangssituation.....	2
2.1	Lebensmittelrechtliche Bestimmungen.....	2
2.2	Apfelsaft.....	4
2.2.1	Herstellung.....	4
2.2.2	Zusammensetzung.....	6
2.3	Fruchtsaftanalytik - Nachweis von Verfälschungen.....	8
2.3.1	Nachweis von Konzentrationsunterschieden.....	8
2.3.2	Fingerprintverfahren.....	9
2.4	Bestimmung von Frucht- und Aminosäuren in komplexer Matrix - Überblick..	10
2.5	Grundlagen verwendeter Methoden.....	13
2.5.1	Kapillargaschromatographie.....	13
2.5.1.1	Massenspektrometrische Detektion.....	14
2.5.1.2	Atomemissionsdetektion.....	16
2.5.2	Derivatisierung von organischen Säuren und Aminosäuren.....	17
3	Problemstellung und Ziel	19
4	Ergebnisse und Diskussion	20
4.1	Entwicklung der in-situ Derivatisierung mit Butylchloroformat (BCF)	20
4.1.1	In-situ Derivatisierung.....	20
4.1.2	Modifizierung der in-situ Derivatisierung.....	21
4.1.2.1	Wahl des Derivatisierungsreagenzes.....	22
4.1.2.2	Wahl des Extraktionsmittels	23
4.1.2.3	Variation weiterer Parameter.....	24
4.1.3	Untersuchung der Umsatzrate bei der Derivatisierung mittels Atomemissionsdetektion.....	24
4.1.4	Zusammenfassung.....	27
4.2	GC-MS der Derivate.....	29
4.2.1	Detektion der Standardverbindungen.....	29
4.2.2	Charakteristika der Massenspektren.....	31

4.2.3	Quantitative Bestimmung der Standardverbindungen.....	35
4.2.4	Zusammenfassung	38
4.3	Quantitative Untersuchung von Fruchtsäften.....	39
4.4	Qualitative Untersuchungen verschiedener Fruchtarten zur Aufnahme von Fingerprints	42
4.4.1	Beerenobst.....	42
4.4.2	Kern- und Steinobst.....	47
4.4.3	Citrusfrüchte.....	50
4.4.4	Ergebnisse und Diskussion	52
4.5	Entwicklung eines Screeningverfahrens für Apfelsäfte über Fingerprinterkennung	54
4.5.1	Fingerprint von Apfelsaft - Kennzeichen	54
4.5.2	Erweiterung der Methode und Absicherung der Ergebnisse	57
4.5.2.1	Ermittlung der Peakflächen.....	57
4.5.2.2	Vergleichbarkeit der Messungen.....	58
4.5.2.3	Reproduzierbarkeit der Messungen.....	59
4.5.3	Untersuchung verschiedener Apfelsaftgruppen	60
4.5.3.1	Apfelsaft aus verschiedenen Apfelsorten (selbst gepreßt)	61
4.5.3.2	Naturtrübe Apfelsäfte	64
4.5.3.3	Direktsäfte.....	66
4.5.3.4	Säfte aus Konzentrat.....	68
4.5.4	Zusammenfassender Vergleich der Gruppen	69
4.5.5	Entwicklung des Apfelsaftprofils zur rechnergestützten Fingerprinterkennung.....	73
4.5.5.1	Negativ-Komponenten.....	73
4.5.5.2	Majorkomponenten.....	73
4.5.5.3	Minorkomponenten	75
4.5.5.4	Das Apfelsaftprofil	79
4.5.6	Vergleich mit anderen Kern- und Steinobstsäften.....	80
4.5.6.1	Kirschsaft.....	80
4.5.6.2	Pfirsichsaft	83
4.5.6.3	Birnensaft.....	85
4.5.7	Untersuchungen von Apfelsaftmischungen	88
4.5.7.1	Verdünnungen von Apfelsaft.....	88

4.5.7.2	Untersuchung eines Apfelfruchtsaftgetränkes	90
4.5.7.3	Mischung mit Birnensaft	92
4.5.7.4	Untersuchung von Säften unbekannter Zusammensetzung	95
4.5.8	Ergebnis und Diskussion	104
4.5.9	Screeningverfahren mit Hilfe des Apfelsaftfilters	105
5	Zusammenfassung.....	107
6	Ausblick	109
7	Literaturverzeichnis	110
8	Anhang.....	123

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Herstellung von Apfelsaft	4
Abb. 2.2: Schema eines Massenspektrometers nach [MCLAFFERTY & TURECEK 1995]14	
Abb. 4.1: Reaktionsablauf der in-situ Derivatisierung mit Butylchloroformat am Beispiel der Milchsäure a.) Derivatisierung der Milchsäure b.) Zerfall des Butylchloroformats in Wasser	21
Abb. 4.2: TIC der Milchsäurederivate mit a.) Hexylchloroformat b.) Butylchloroformat (GC-MS-Bedingungen siehe Anhang B)	22
Abb. 4.3: Vergleich der Extraktionsmittel Toluol, Ethylacetat und Hexan über die mittleren Peakflächen der Verbindungen des TIC-Chromatogrammes	23
Abb. 4.4: Eichgerade ermittelt aus dem Kohlenstoffresponse der Butylester von Malein-, Bernstein- und Benzoesäure	26
Abb. 4.5: Schematische Darstellung der in-situ Derivatisierung von Frucht- und Aminosäuren in Fruchtsäften.....	28
Abb. 4.6: TIC-Chromatogramm einer Standardmischung (10 mg/L je Substanz) a.) vergrößerte Darstellung zwischen 14,0 und 14,8 min.....	29
Abb. 4.7: Massenspektrum des Äpfelsäurebutylderivates.....	32
Abb. 4.8: Massenspektrum des Glycinbutylderivates	33
Abb. 4.9: Massenspektrum des Benzoesäurebutylderivates	33
Abb. 4.10: Vergrößerung des TIC-Chromatogrammes zwischen 13,0 und 15,0 min und Ionenspuren der Derivate von Fumar-, Milch-, Glycol-, Bernstein- und Maleinsäure	35
Abb. 4.11: Eichgeraden in zwei Konzentrationsbereichen oben: 1-30 mg/L von Malonsäure, Glycin, Leucin und Asparagin unten: 70-1000 mg/L von Äpfel- und Citronensäure, Prolin und Valin.....	37
Abb. 4.12: Schwankungen des Asparaginresponse in 47 untersuchten Apfelsäften	40
Abb. 4.13: TIC-Chromatogramm eines derivatisierten Erdbeersaftes, selbst gepreßt (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)	43
Abb. 4.14: TIC-Chromatogramm eines derivatisierten Traubensaftes, selbst gepreßt (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)	45
Abb. 4.15: TIC-Chromatogramm eines derivatisierten Kirschsftes, selbst gepreßt (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)	47

Abb. 4.16: TIC-Chromatogramm eines derivatisierten Pfirsichsaftes, selbst gepreßt (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)	49
Abb. 4.17: TIC-Chromatogramm des derivatisierten Grapefruitsaftes (Fa. Reichelt Berlin, 100 %-Saft, direkt gepreßt, GC-MS-Bedingungen in Anhang B)	50
Abb. 4.18: TIC-Chromatogramm des derivatisierten Orangensaftes (Fa. Reichelt Berlin, 100 %-Saft, aus Konzentrat, GC-MS-Bedingungen in Anhang B)	52
Abb. 4.19: TIC eines Apfelsaftes (Fa. Klindworth, Direktsaft 100 %, GC-MS-Bedingungen in Anhang B)	54
Abb. 4.20: Vergrößerte Darstellung des TIC von Apfelsaft zwischen 25 min und 32 min (Ausschnitt aus Abb. 4.19)	56
Abb. 4.21: Prozentuale Abweichungen des normierten Response vom Mittelwert in verschiedenen Apfelsorten	62
Abb. 4.22: Fingerprints zweier selbst hergestellter Apfelsäfte (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)	63
Abb. 4.23: TIC-Chromatogramm des Apfelsaftes aus dem Apfel „Morgenduft“ aus Tirol (Italien), (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)	63
Abb. 4.24: Fingerprints zweier naturtrüber Apfelsäfte unterschiedlicher Herkunft (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)	64
Abb. 4.25: Prozentuale Abweichungen des normierten Response vom Mittelwert in naturtrüben Apfelsäften	65
Abb. 4.26: Fingerprints zweier Direktsäfte unterschiedlicher Herkunft (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)	66
Abb. 4.27: Prozentuale Abweichungen des normierten Response vom Mittelwert in Direktsäften	67
Abb. 4.28: Fingerprints zweier Apfelsäfte aus Konzentrat unterschiedlicher Herkunft (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)	68
Abb. 4.29: Prozentuale Abweichungen des normierten Response vom Mittelwert in Apfelsäften aus Konzentrat	69
Abb. 4.30: Vergleich des prozentualen Anteiles der Majorkomponenten am Gesamtresponse in den verschiedenen Apfelsaftgruppen	70
Abb. 4.31: Vergleich der Summe aller gemessenen Verbindungen in den verschiedenen Apfelsaftgruppen	71
Abb. 4.32: Vergleich des normierten Response der Äpfelsäure in den verschiedenen Apfelsaftgruppen	71

Abb. 4.33: Anteil der Majorkomponenten am Gesamtresponse der untersuchten Frucht- und Aminosäuren	74
Abb. 4.34: Anteil des Response der Äpfelsäure am Response der Majorkomponenten bei den untersuchten Apfelsäften.....	74
Abb. 4.35: Absoluter normierter Asparaginresponse in den untersuchten Apfelsäften..	75
Abb. 4.36: Anteil der Minorkomponenten am Gesamtresponse der Frucht- und Aminosäuren am Beispiel eines Apfelsaftes	76
Abb. 4.37: Normierter Phenylalaninresponse (absolut) in den untersuchten Apfelsäften	77
Abb. 4.38: Normierter Prolinresponse (absolut) in den untersuchten Apfelsäften.....	77
Abb. 4.39: TIC-Chromatogramm eines derivatisierten Birnen-Direktsaftes, (Fa. Bauer Fruchtsaft GmbH, GC-MS-Bedingungen in Anhang B).....	85
Abb. 4.40: TIC-Chromatogramm eines Apfelsaftes aus Konzentrat mit 30 % Wasser verdünnt (GC-MS-Bedingungen in Anhang B).....	88
Abb. 4.41: TIC-Chromatogramm eines Apfelfruchtsaftgetränkes mit mindestens 30 % Fruchtgehalt (GC-MS-Bedingungen in Anhang B).....	90
Abb. 4.42: TIC-Chromatogramme von reinem Apfelsaft und Mischungen mit 30 % und 5 % Birnensaft (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)	93
Abb. 4.43: TIC-Chromatogramm des Fruchtsaftes 1, Blindprobe (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)	96
Abb. 4.44: TIC-Chromatogramm des Fruchtsaftes 2, Blindprobe (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)	98
Abb. 4.45: TIC-Chromatogramm des Fruchtsaftes 3, Blindprobe (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)	100
Abb. 4.46: TIC-Chromatogramm des Fruchtsaftes 4 Blindprobe (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)	102
Abb. 4.47: Screeningverfahren mit Hilfe der in-situ Methode und dem daraus entwickelten Apfelsaftfilter	106

Abkürzungsverzeichnis

AED		<u>A</u> tom <u>e</u> missions <u>d</u> etektor
AIJN	EC association of the fruit juice industry	EG Verband der Fruchtsaftindustrie
AS		<u>A</u> minos <u>ä</u> uren
BCF		<u>B</u> utyl <u>c</u> hloro <u>f</u> ormat
CE	<u>C</u> apillary <u>e</u> lectrophoresis	Kapillarelektrophorese
CoP	<u>C</u> ode of <u>P</u> ractice	
EG		Europäische Gemeinschaft
EI	<u>E</u> lectron <u>i</u> mpact	<u>E</u> lektronen <u>i</u> onisation
EU		<u>E</u> uropäische <u>U</u> nion
Fa.		<u>F</u> irma
FrS		<u>F</u> ruchts <u>ä</u> uren
GC		<u>G</u> as <u>c</u> hromatographie
HCF		<u>H</u> exyl <u>c</u> hloro <u>f</u> ormat
HP		<u>H</u> ewlett- <u>P</u> ackard
HPLC	<u>H</u> igh performance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography	Hochdruck-Flüssig-Chromatographie
Jg.		<u>J</u> ahrgang
MS		<u>M</u> assens <u>p</u> ektrometrie
MSD		<u>M</u> assenselektiver <u>D</u> etektor
p. A.	<u>P</u> er <u>a</u> nalysis	
RP	<u>R</u> eversed <u>p</u> hase	Umkehrphase
RSK		<u>R</u> ichtwerte und <u>S</u> chwankungsbreiten bestimmter <u>K</u> ennzahlen
Rt	<u>R</u> etention <u>t</u> ime	Retentionszeit
SIM	<u>S</u> electe <i>d</i> <u>i</u> on <u>m</u> onitoring	Aufzeichnung ausgewählter Ionenspuren
TIC	<u>T</u> otal <u>i</u> on <u>c</u> urrent	Totalionenstrom
Vgl.		<u>V</u> ergleiche
Vk		<u>V</u> ariations <u>k</u> oeffizient
z. A.		zur <u>A</u> nalys <i>e</i>

1 Einleitung

Verfälschungen von Lebensmitteln sorgen immer wieder für Schlagzeilen. Früher wurden verblichene Teeblätter mit Ruß geschwärzt, um ihnen ein frisches Aussehen zu geben, im 19. Jahrhundert wurden Milch und Bier häufig mit Wasser verdünnt und sogar Wein aus künstlichen Zutaten hergestellt [HESFORD 1997; LOW 1997]. Auch Fruchtsäfte sind stets Ziel von Verfälschungen, da es sich um Naturprodukte mit strengen Reglementierungen handelt. Sie dürfen nur aus dem Saft der entsprechenden Frucht hergestellt werden ohne Einsatz von Zusatzstoffen, zusätzlichem Süßen oder Färben. Solche Naturprodukte können abhängig vom Weltmarktpreis sehr teuer sein.

Der Apfelsaft ist in Deutschland die Nummer eins unter den Säften und wird auch in Europa und den USA gern und viel getrunken. Oberflächlich betrachtet handelt es sich dabei um ein einfach zusammengesetztes Produkt aus 88 % Wasser, 10 % Zucker, etwas Äpfelsäure und Mineralstoffen. Es ist daher nicht verwunderlich, daß bei Mangel an Mostäpfeln und daraus resultierend hohen Preisen auf dem Weltmarkt, Fälscher immer wieder in Versuchung geführt werden, dieses Naturprodukt durch den Zusatz künstlicher Zutaten nachzuahmen. Erst 1996 gab es zwei Verfälschungsfälle, bei denen der Apfelsaft durch Zugabe von Fructosesirup aus Inulin gefälscht wurde [HESFORD 1996, 1997]. Auch in Zukunft wird es zu Verfälschungen gleich welcher Art kommen, und es ist die Aufgabe von Industrie und Lebensmittelüberwachung sehr gute analytische Methoden zu ihrer Erkennung zu entwickeln oder weiterzuentwickeln.

Methoden, die sich schon oft bewährt haben, sind die *Fingerprintverfahren*. Sie liefern Daten, die so einzigartig wie eine Unterschrift oder ein Daumenabdruck sind. Diese Daten sind leicht zugänglich und auch ohne viel Erfahrung auswertbar. Mit Hilfe dieser Methoden konnten Verfälschungen aufgedeckt werden, bei denen sonst aussagekräftige und recht teure Methoden wie die Isotopenuntersuchung versagen [HESFORD 1997]. Da sie aber auf bestimmte Inhaltsstoffe wie Zucker, Polyphenole, Flavone oder Säuren ausgerichtet sind und nicht den Saft als Gesamtheit untersuchen, sind Spezialisten bei einer endgültigen Bewertung des Saftes unerlässlich. Die sinnvolle Kombination von einfachen, schnellen Fingerprintmethoden mit aufwendiger Einzelstoffanalytik kann dazu beitragen, in Zukunft die Möglichkeiten der Verfälschungen einzuschränken und schwieriger zu gestalten. Der Entwicklung neuer und der Verfeinerung vorhandener Methoden sollte daher immer genügend Beachtung geschenkt werden.

2 Allgemeine Grundlagen - Ausgangssituation

2.1 Lebensmittelrechtliche Bestimmungen

Die Ziele lebensmittelrechtlicher Bestimmungen, seien es Gesetze und Verordnungen oder Richtlinien, Leitsätze und Handelsbrauch, sind einerseits der Schutz des Verbrauchers und andererseits das Aufstellen einheitlicher Regeln für Hersteller und Kaufleute in einem fairen Wettbewerb. Für die Herstellung und den Verkauf von Fruchtsäften gilt nach deutschem Lebensmittelrecht die **Fruchtsaft-Verordnung** (Fruchtsaft-VO) in der Fassung vom 17. Februar 1982. Nur sie besitzt Rechtskraft, aus ihr können Gebote und Verbote abgeleitet werden. In der Fruchtsaft-VO sind die Definitionen für Fruchtsaft und konzentrierten Fruchtsaft festgelegt, sowie die Bedingungen zur Herstellung und deren Bezeichnung geregelt. Die Definition für Fruchtsaft lautet danach:

„Fruchtsaft ist der mittels mechanischer Verfahren aus Früchten gewonnene gärfähige aber nicht gegorene Saft, der die charakteristische Farbe, das charakteristische Aroma und den charakteristischen Geschmack der Säfte der Früchte besitzt, von denen er stammt.... Als Fruchtsaft gilt auch das Erzeugnis, das aus konzentriertem Fruchtsaft durch Zuführung der dem Saft bei der Konzentrierung entzogenen Menge Wasser hergestellt wird, wobei das Wasser insbesondere in chemischer, mikrobiologischer und organoleptischer Hinsicht so beschaffen sein muß, daß die wesentlichen Eigenschaften des Saftes nicht beeinträchtigt werden. Das Aroma dieses Erzeugnisses muß mit Hilfe der flüchtigen Aromastoffe, die bei der Konzentrierung des ursprünglichen Fruchtsaftes oder von Säften derselben Fruchtart aufgefangen worden sind, wiederhergestellt werden. Das bei der Konzentrierung des ursprünglichen Fruchtsaftes oder von Säften derselben Art abgetrennte Fruchtfleisch darf dem Erzeugnis bis zu der im ursprünglichen Saft enthaltenen Menge wieder zugeführt werden....“ [FRUCHTSAFT-VO 1998]

Weitere Regeln für den Verkehr von Fruchtsaft, wie die **RSK-Werte** (Richtlinien und Schwankungsbreiten bestimmter Kennzahlen) des Verbandes der deutschen Fruchtsaftindustrie, die **Leitsätze für Fruchtsäfte** der Kommission des Deutschen Lebensmittelbuches in der Neufassung vom 14. Mai 1982, die **EG-Richtlinie 93/77/EWG** des „Rates für Fruchtsäfte und einige gleichartige Erzeugnisse“ vom 21. September 1993 und der erstmals 1990 von der AIJN (EG Verband der Fruchtsaftindustrie)

veröffentlichte **Code of Practice** (CoP) sind Ausdruck von Verkehrsauffassungen oder von Handelsbräuchen. Sie bilden keine Rechtsnormen, stellen aber Regeln, Hersteller-richtlinien und damit Instrumentarien der Fruchtsaftbranche für einen fairen Wettbewerb dar. Es sind Ergänzungen zu den in Rechtsvorschriften oftmals unbestimmten Begriffen, die im Einzelfall einer Auslegung bedürfen. Sie geben Definitionen, Höchst- und Mindestwerte vor. Die Fruchtsaftleitsätze stellen ein objektives Sachverständigengutachten zum Handelsbrauch dar [SENNEWALD 1995; HAHN 1996] und sind in allgemeine und besondere Beurteilungsmerkmale für bestimmte Fruchtsäfte unterteilt.

Der CoP steht in engem Zusammenhang mit der EG-Fruchtsafttrichtlinie und beschreibt einen von allen Ländern der Europäischen Union (EU) anerkannten Handelsbrauch. Die Neufassung von 1993 für bisher fünf Fruchtarten umfaßt Werte für Orange, Apfel, Grapefruit, Traube und Ananas und ist inhaltlich in zwei Teile gegliedert:

- a.) Zusammenfassung von einzuhaltenden Mindestwerten, vergleichbar mit den Leitsätzen für Fruchtsäfte
- b.) Authentizitätskriterien, vergleichbar mit den RSK-Werten.

Der CoP kann als Ergebnis der Harmonisierung der Verkehrsauffassung innerhalb des europäischen Marktes und dadurch als ein Mehr an Verbraucherschutz gewertet werden [KORTH 1991].

Die deutschen RSK-Werte werden hin und wieder irrtümlich als Regeln oder Normen gebraucht, umfassen aber lediglich eine Beschreibung der natürlichen Beschaffenheit von Fruchtsäften. Sie sind eine Hilfe zur Beurteilung der Säfte, um Identität und Authentizität zu überprüfen, jedoch ohne Qualitätsüberlegungen. Sie geben keine Einstufung der Verkehrsfähigkeit, sondern sind als eine wissenschaftliche Abhandlung über die Zusammensetzung von Fruchtsäften zu werten. So sind Ausnahmen in der Natur durchaus möglich.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß zur Beurteilung von Fruchtsaft die Fruchtsaft-Verordnung und die Zusatzstoffzulassungsverordnung als Gesetze und zusätzlich eine Reihe von Richtlinien und Leitsätzen herangezogen werden können. Durch die Harmonisierung des EG-Binnenmarktes und die Einführung verbesserter Technologien bei der Verarbeitung der Früchte (z.B. der Einsatz neuer Enzympräparate) ist ein ständiger Bedarf vorhanden, geltende Vorgaben und Gesetze zu diskutieren und zu überarbeiten.

2.2 Apfelsaft

Keine andere Obstsorte spielt in Deutschland eine so bedeutende Rolle wie der Apfel. Rund 60 % der gesamten Obsternte sind Äpfel und aus einem Teil werden jedes Jahr rund 1 Milliarde Liter Saft produziert. Dabei braucht man für einen Liter ca. drei Pfund Äpfel. Die Saftausbeute liegt damit je nach Verfahren zwischen 75-80 % [VDF-VERBAND 1998].

2.2.1 Herstellung

Zur Herstellung von Apfelsaft werden die Äpfel nach der Anlieferung zunächst gewaschen und verlesen und anschließend zu Maische gemahlen (siehe Abb. 2.1). Die Maische wird gepresst und aus dem entstehenden trüben Saft werden durch Zentrifugieren größere Trubpartikel entfernt.

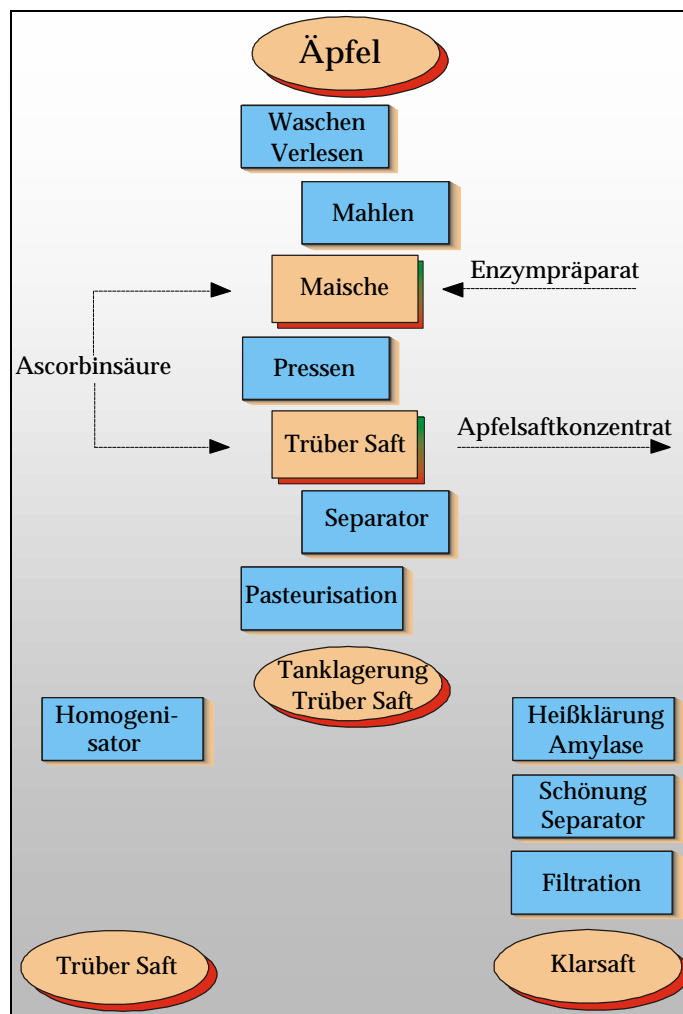


Abb. 2.1: Herstellung von Apfelsaft

Das Zentrifugieren dient auch der mechanischen Abtrennung der in Äpfeln enthaltenen Stärkekörner, bevor diese durch Erhitzen gelöst werden und nur noch schwer zu

entfernen sind. Zur besseren Haltbarkeit und Desaktivierung der im Apfel enthaltenen Enzyme wird der Saft kurz auf ca. 80 °C erhitzt (Pasteurisation) und anschließend im Tank gelagert. Während der Tanklagerung setzen sich große Partikel und höhermolekulare Verbindungen ab, die nicht trubstabil sind.

Für die Herstellung **trüber Säfte** wird der gelagerte Saft homogenisiert und dann abgefüllt. Durch die Homogenisierung wird die Partikelgröße auf max. 3 µm reduziert und damit eine Voraussetzung für eine kolloidstabile Trübung geschaffen. Größere Teilchen könnten sich auf Dauer nicht in der „Schwebe“ halten und würden sich am Boden absetzen [BINNIG 1992; HAMATSCHEK & PECORONI 1996].

Die Herstellung eines **klaren Apfelsaftes** erfordert zusätzliche Verfahrensschritte wie:

- Die Heißklärung mit Amylase, um noch vorhandene, gelöste Stärke abzubauen;
- Die Schönung mit Betonit, Gelatine oder Adsorberharzen, um färbende Substanzen wie Polyphenole zu entfernen [WEINAND 1994; SCHOBINGER et al. 1996];
- Die Ultra- oder Nanofiltration zur Abtrennung höhermolekularer Verbindungen, die eine unerwünschte Nachtrübung des klaren Saftes verursachen würden.

Apfelsaftkonzentrat wird aus dem Saft durch Entzug von ca. 50 % Wasser mittels Vakuumverdampfer erzeugt und die dabei entweichenden flüchtigen Aromastoffe in Aromastoffabscheidern aufgefangen. Das Konzentrat wird gelagert bzw. transportiert und nach Rückverdünnung und Aromarückführung der Apfelsaft wieder hergestellt.

Auf die Herstellung bzw. die Qualität insbesondere von klarem Apfelsaft wirken sich einige Inhaltsstoffe des Apfels negativ aus. Dazu gehören Stärke, Pektin, Proteine, Cellulose und Hemicellulose. Pektin und gelöste Stärke wirken wie Schutzkolloide und sind daher in der Lage, Trubpartikel durch Stabilisierung in Lösung zu halten. Eine vollständige Klärung des Saftes wird daher erst nach ihrem Abbau möglich. Aus diesem Grund wird der hydrolytische Abbau schon in der Maische durch Zusatz pektolytischer und amolytischer Enzympräparate eingeleitet. Dies schafft nicht nur die Voraussetzung für die spätere Klärung des Saftes, sondern führt auch zu einem besseren Saftfluß und damit zu einer höheren Ausbeute [GRASSIN 1992; STUTZ 1996; WILL & DIETRICH 1992; DIETRICH & WILL 1996]. Da die eingesetzten Enzympräparate nur zum Teil gereinigte Enzyme darstellen, weisen sie neben den Hauptaktivitäten (Pektinasen, Amylasen) häufig auch Neben- oder Fremdaktivitäten wie Cellulasen oder Hemicellulasen auf. Diese Nebenaktivitäten sind durchaus erwünscht, da sie ebenfalls zur Verflüssigung beitragen [WUCHERPFENNIG et al. 1990].

Gelingt der vollständige Abbau der gelösten Stärke nicht, kommt es zur Kristallisation der Stärke und zur Ausbildung hartnäckiger Trübungen in klaren Säften. In trüben Säften entstehen durch retrogradierte Stärke unansehnliche Grauschleier.

Pflanzenphenole können ebenfalls Ursache von Nachtrübungen oder Nachfärbungen verursacht durch Oxidation sein. Ihre Entfernung durch Klärung und Schönung trägt daher zu einem stabileren Produkt bei [SCHOBINGER et al. 1996].

2.2.2 Zusammensetzung

Apfelsaft besteht zu 88 % aus *Wasser* und zu ca. 10,5 % aus *Zucker*. Letzterer setzt sich zum Großteil aus den reduzierenden Zuckern Fructose und Glucose und einem geringeren Anteil aus Saccharose zusammen. Die noch verbleibenden 1,5 % verteilen sich auf die anderen Inhaltsstoffe wie *Fruchtsäuren*, *Mineralstoffe*, *Aminosäuren*, *Pflanzenphenole* und *Vitamine*.

Die *Fruchtsäuren*¹ sind in erster Linie für den sauren Geschmack und den niedrigen pH-Wert verantwortlich, wobei die Äpfelsäure mit einem Anteil von 70 – 90 % an der Gesamtsäure vorherrscht. In geringen Mengen kommen Isocitronensäure, Citronensäure und Chinasäure vor [SCHOBINGER 1987; SCHUMANN 1994].

Durch den enzymatischen Abbau von Pektin bei der Herstellung von Apfelsaft entsteht Galacturonsäure wodurch sich die Säurezusammensetzung ändert. Das Verhältnis der titrierbaren Gesamtsäure zu Äpfelsäure wird dadurch beeinflusst und kann sogar so stark verändert werden, daß es nicht mehr den RSK-Werten entspricht [STUTZ 1996]. Da der Einsatz von Pektinasen und seit 1998 auch ein Zusatz von Citronensäure bis 3 g/l zulässig sind [ZUSATZSTOFFZULASSUNGS-VO 1998], sollten die RSK-Werte hinsichtlich dieses Verhältnisses überarbeitet und den modernen Technologien angepaßt werden. Im CoP, an dem der RSK-Unterausschuß beratend mitarbeitet, ist dies bereits berücksichtigt [AIJN 1991].

In geringen Konzentrationen sind weitere Inhaltsstoffe vorhanden, die für den Geschmack und die Qualität des Saftes von entscheidender Bedeutung sind. *Die Polyphenole*, wie Chlorogensäure, Kaffeesäure, Quercetin oder Phloridzin machen nur wenige hundert Milligramm bis max. 3 g/l [LEA 1984] im Apfelsaft aus, sie spielen bei

¹ Unter *Fruchtsäuren* werden in dieser Arbeit nicht nur die Hydroxycarbonsäuren, die den Hauptteil der Säuren im Fruchtsaft ausmachen verstanden, sondern noch weitere für Fruchtsaftuntersuchungen wichtige organische Säuren. Dazu gehören u. a. die Milch-, Bernstein- oder Fumarsäure.

der geschmacklichen Gesamtqualität, der Bitterkeit, der Adstringenz und Farbstabilität aber eine große Rolle [SCHOBINGER et al. 1996].

Im Hinblick auf die *Analytik und Prüfung* der Authentizität von Apfelsaft sind neben den Zuckern gerade die Minorkomponenten wie Pflanzenphenole, organische Säuren und Aminosäuren ausschlaggebend. Sie weisen eine artspezifische Zusammensetzung auf und sind nur mit einigem Aufwand zu fälschen [EVANS et al. 1983; GOMIS et al. 1987 und 1988; HERRMANN 1994; SCHOBINGER et al. 1996; ANDRADE et al. 1998; SUÁREZ et al. 1998].

2.3 Fruchtsaftanalytik - Nachweis von Verfälschungen

Die Unverfälschtheit von Lebensmitteln ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal. Daher ist der Nachweis von Verfälschungen bzw. der Reinheit eines Produktes von großer Bedeutung. Dieser kann anhand von qualitativen und quantitativen Bestimmungen geführt werden. Prinzipiell gibt es zwei unterschiedliche Strategien, Verfälschungen nachzuweisen:

- Der Nachweis deutlicher Konzentrationsunterschiede, der sich an Grenzwerten, Richtlinien und Schwankungsbreiten für einzelne Stoffe orientiert.
- Fingerprintverfahren, die das Auftreten artfremder oder das Fehlen fruchttypischer Inhaltsstoffe erfassen und für die Beurteilung nutzen.

Beide Strategien sollen kurz dargestellt werden.

2.3.1 Nachweis von Konzentrationsunterschieden

Der Nachweis von Konzentrationsunterschieden setzt einen Maßstab bzw. Richtlinien voraus, mit denen die untersuchte Probe hinsichtlich Übereinstimmungen oder Abweichungen fruchtspezifisch festgelegter Inhaltsstoffe verglichen werden kann. In Deutschland sind zur Beschreibung der üblichen Beschaffenheit und damit der Verkehrsfähigkeit von Fruchtsäften die RSK-Werte eingeführt worden. Sie schlagen Richtwerte und Schwankungsbreiten vor, die die möglichen Unterschiede aufgrund von Klima, Sorte, Verarbeitung usw. berücksichtigen. Dabei muß aber beachtet werden, daß die Konzentrationsunterschiede der einzelnen Inhaltsstoffe erheblich sein können und daher weite Grenzwertbereiche festgelegt werden müssen. Dies hat zur Folge, daß einerseits geschickt manipulierte Säfte innerhalb der Schwankungsbreiten liegen können so daß die Verfälschungen nicht erkannt werden, andererseits reine Säfte mit extrem hohen bzw. niedrigen Werten einzelner Inhaltsstoffe den Richtlinien nicht mehr entsprechen und beanstandet werden müßten [HERRMANN 1994; WUCHERPFENNIG 1990; HESFORD 1997].

In der vorliegenden Arbeit werden u.a. Aminosäuren untersucht, die bisher in erster Linie bei der Beurteilung von Orangen- und Grapefruitsäften eine wichtige Rolle spielen [KOCH 1986; WALLRAUCH 1985; RSK-WERTE 1987]. In holländischen Arbeiten [OOGHE 1984] werden sie auch für Apfelsaft als Authentizitätskriterien vorgeschlagen, aber aufgrund starker Schwankungen der einzelnen Werte von anderen Autoren [BIELIG & HOF SOMMER 1982; SPRÖER 1985] abgelehnt.

Für diese Untersuchungsstrategie, Konzentrationsunterschiede anhand von Richtlinien und Grenzwerten nachzuweisen, ist es notwendig, viele zum Teil sehr aufwendige Bestimmungen durchzuführen, um alle für die Beurteilung erforderlichen Werte zu ermitteln. Dies ist ein recht kosten- und zeitaufwendiges Verfahren und -wie oben dargestellt- nicht immer eindeutig.

2.3.2 Fingerprintverfahren

Der andere Weg Fälschungsversuche aufzudecken, ist die Untersuchung charakteristischer Muster oder Verhältnisse von Inhaltsstoffen, die durch Zugabe einzelner Verbindungen oder eines artfremden Saftes verändert werden. Solche artspezifischen Muster werden Fingerprints genannt. Untersucht werden dabei sowohl sekundäre Inhaltsstoffe der Früchte wie Flavonoide, Carotinoide oder Anthocyane [HESFORD 1997; FUCHS & KOSWIG 1997; WADE 1992; EVANS 1996], als auch Oligosaccharide [HAMMOND 1992; PILANDO & WROLSTAD 1992; LOW 1996, 1997]. Solche Fingerprints haben schon häufig zur Aufklärung von Verfälschungen geführt. Die zugrundeliegenden Methoden nutzen sogenannte Markersubstanzen, die in bestimmten Fruchtarten in hohen Konzentrationen typisch sind und in anderen fast fehlen wie z. B. Phloretin in Apfel [SONTAG & BERNWIESER 1994], Arbutin in Birne [HERRMANN 1994] oder Hesperidin und Hydroxyzimtsäuren in Orange [FUCHS & KOSWIG 1997; RAPISARDA et al 1998].

Frucht- und Aminosäuren weisen ebenfalls artspezifische Muster auf, die sich für Fingerprintmethoden anbieten:

Im Wesentlichen sind acht Aminosäuren (*Prolin*, *Asparaginsäure*, *Glutaminsäure*, *Serin*, *Asparagin*, *Arginin*, *Alanin* und γ -*Aminobuttersäure*) unabhängig von der Art der Frucht für das spezifische Aminosäure-Spektrum verantwortlich. Sie machen ca. 90-95 % der freien Aminosäuren des Fruchtsaftes aus [NAGY et al. 1988].

Zu den Hauptsäuren (ca. 50-90 % der Gesamtsäure) verschiedener Fruchtarten zählen die *Citronensäure* in Beerenobst, Citrusfrüchten und anderen tropischen Früchten, die *Weinsäure* in Trauben, die *Isocitronensäure* in Brombeeren und die *Äpfelsäure* in Kern- und Steinobst.

Versuche, diese beiden Verbindungsgruppen für Fingerprintmethoden zu nutzen, sind nicht bekannt. Mit ihrer Hilfe können ähnlich wie bei den Pflanzenphenolen bestimmte Verfälschungen erkannt werden. Bisher werden Fruchtsäuren lediglich in Einzelbestimmungen über Richtlinien und Grenzwerte, die Aminosäuren sogar nur als erweiterte Analyse zur Beurteilung von Orangen-, Grapefruit- und Maracujasaft herangezogen.

Da die Fingerprints immer nur bestimmte Verbindungsklassen wiedergeben, können einzelne Methoden nicht alle Verfälschungsarten nachweisen. So kann z. B. ein Fingerprint der Pflanzenphenole den unerlaubten Zusatz von Zucker nicht erfassen, sondern „nur“ die Verfälschung mit artfremden Früchten. Die Kombination mehrerer Methoden ist also auch hier notwendig.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß weder der Nachweis von Konzentrationsunterschieden anhand von Richtlinien allein, noch einzelne Fingerprintverfahren Verfälschungen mit absoluter Sicherheit nachweisen bzw. ausschließen können. Beide Strategien in Kombination geben dem Analytiker bzw. Sachverständigen aber ausreichend Möglichkeiten, Fälschungspraktiken sicher aufzudecken. So können Fingerprintverfahren neben der direkten Aufdeckung sehr spezieller Fälschungen dazu dienen, grobe Verfälschungen sofort zu erkennen und verdächtige Produkte zu identifizieren, die dann Untersuchungen mit spezifischen Methoden unterzogen werden.

2.4 Bestimmung von Frucht- und Aminosäuren in komplexer Matrix - Überblick

Die Untersuchung von Fruchtsäften mit Hilfe der Fingerprintverfahren, wie sie im vorangegangenen Kapitel skizziert wurde, setzt Analysenmethoden voraus, die nach chromatographischer Auftrennung der Inhaltsstoffe charakteristische Peakmuster liefern. Die in dieser Arbeit untersuchten organischen Säuren und Aminosäuren sind natürlich nicht nur in Fruchtsäften, sondern auch in der Umwelt und im Stoffwechsel des Menschen von großer Bedeutung. Daher wurden entsprechend der analytischen Problemstellung vielfältige Bestimmungsmethoden entwickelt. Neben spektroskopischen und enzymatischen Methoden, die in der Regel immer nur *eine* Säure bestimmen können, haben sich für komplexe Matrices in *Lebensmitteln* [GROSHENY et al. 1995; JAMIN et al. 1997; DYREMARK & ERICSSON 1990], in der *Medizin* [LIEBICH & FÖRST 1990; SPITELLER & SPITELLER 1979; LORD & STRINGHAM 1996] und der *Umwelt* [SHARMA et al. 1998; PELDSZUS et al. 1998] vor allem die chromatographischen Methoden wie Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) oder Gaschromatographie (GC) durchgesetzt. Diese ermöglichen die Analyse eines Stoffgemisches nach chromatographischer Auftrennung.

Fruchtsäfte stellen eine komplexe wäßrige Matrix dar, daher sollen aus der Vielzahl der Methoden nur solche aufgeführt werden, die für wäßrige Medien entwickelt wurden, um anschließend die in dieser Arbeit entwickelte und angewendete Methode einordnen zu

können. Aufgrund der Menge analytischer Bestimmungsmethoden für beide Verbindungsklassen kann hier nur einen Überblick gegeben werden, welche Analysenprinzipien grundsätzlich Anwendung finden. Für eine detaillierte Beschreibung der Methoden sei auf die entsprechende Literatur verwiesen.

Sowohl für organische Säuren als auch für Aminosäuren stehen Methoden auf dem Gebiet der HPLC wie *ionenchromatographische Methoden* [SCALIA et al. 1998; YOKOYAMA et al. 1996; HEMPEL 1998] oder Trennung an *Umkehrphasen* (reversed phase; RP-C18) nach *Derivatisierung* [CHAYTOR 1986; BJÖRKLUND et al. 1998] im Vordergrund.

Weit weniger wurden *gaschromatographische Methoden* für wäßrige Proben entwickelt [FRANKE et al. 1995; KAWAMURA 1993; BURROWS 1998; ZUMWALT et al. 1987], da die polaren Säuren und Aminosäuren der GC schwer zugänglich sind.

Für matrixreiche Proben wie Fruchtsäfte hat in den letzten Jahren die *Kapillarelektrophorese* (CE) wegen der hohen Trennstufenzahl und dem resultierenden hohen Auflösungsvermögen an Bedeutung erlangt [TAGA et al. 1998; KUROSU et al. 1998; KENNEY 1991].

Problematisch ist hier jedoch die Detektion, da Erfahrungen hauptsächlich im UV/VIS-Bereich vorliegen und die unempfindlichen Säuren nur durch indirekte UV-Detektion [CHEN et al. 1997] oder nach Derivatisierung [LIU & PIETRZYK 1998] detektiert werden können. Andere Detektionsmethoden, wie die Leitfähigkeitsdetektion mit *ion-suppression*-Technik sind für die CE in der Entwicklung [DASGUPTA & BAO 1993; AVDALOVIC et al. 1993].

Allen Methoden ist gemeinsam, daß sich wegen des hydrophilen Charakters der Säuren und der zum Teil ähnlichen Strukturen oder keiner bzw. nur geringer UV-Aktivität Probleme bei der Trennung und Detektion ergeben. Mit den zur Zeit existierenden Methoden kann jeweils nur eine bestimmte Substanzgruppe wie Di- und Tricarbonsäuren, Hydroxysäuren oder Aminosäuren oder nur wenige gemeinsam bearbeitet werden [WEISS & REINHARD 1995]. Dabei sind die Verfahren für einzelne Substanzklassen oder Analyten zum Teil sehr leistungsfähig, z.B. HPLC mit Hilfe von Gradientenelution und Ionenaustauschersäulen [JUNGE & SPADINGER 1982; FULEKI et al. 1995] oder Isotopenanalysen [COLQUHOUN 1998; GONZALES et al. 1998].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß für einzelne Verbindungen oder Substanzklassen sehr leistungsfähige chromatographische Verfahren zur Verfügung stehen, die jedoch meist mit einem erheblichen Aufwand an Probenvorbereitung

verbunden sind. Es ist keine Methode beschrieben, die die gleichzeitige Bestimmung von Aminosäuren, α -Hydroxycarbonsäuren, Di- und Tricarbonsäuren oder aromatischen Säuren in wäßrigen Medien erlaubt. Der hydrophile Charakter, die ungenügende UV-Aktivität und zum Teil strukturelle Ähnlichkeit erschweren die gemeinsame Analyse in komplexen Matrices.

Als Lösung zu diesem Problem bietet sich die Derivatisierung der funktionellen Gruppen an, wodurch die Analyten nach Einführung chromophorer Gruppen oder Maskierung der vorhandenen polaren Gruppen besser detektiert bzw. chromatographiert werden können. Verschiedene Derivatisierungsmöglichkeiten werden in Kapitel 2.5.2 angesprochen.

2.5 Grundlagen verwendeter Methoden

2.5.1 Kapillargaschromatographie

Die GC mit Kapillarsäulen ist ein modernes und sehr leistungsfähiges chromatographisches Trennverfahren. Es beruht auf der multiplikativen Verteilung der zu trennenden Komponenten einer Mischung zwischen zwei Phasen. Die Probenmischung wird dabei durch die mobile Phase (inertes Gas) an der stationären Phase vorbei transportiert. Aufgrund unterschiedlicher Verteilungskoeffizienten zwischen mobiler und stationärer Phase wandern die Komponenten mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch die Säule und werden dabei getrennt. In der Kapillargaschromatographie handelt es sich um Säulen aus „fused silica“, Alkali- oder Boratglas mit einem Innendurchmesser von 30 – 500 µm. Die stationäre Phase befindet sich als dünner Film (0,05 – 10 µm) auf der Innenwand der Säule, weshalb selbst bei Säulenlängen bis 100 m der Druckabfall sehr gering ist. Die Effizienz dieses Säulentyps, bedingt durch die hohe Gesamttrennstufenzahl², wird von keinem anderen Zweig der Chromatographie erreicht [SCHOMBURG 1987].

Die GC trennt die Komponenten in der Gasphase und ist daher insbesondere für die Analytik flüchtiger Verbindungen von großer Bedeutung. Sie ist in ihrem Anwendungsgebiet auf solche Verbindungen beschränkt, die ausreichend flüchtig bzw. ohne Zersetzung bei höheren Temperaturen verdampfbar sind. Schwer flüchtige, sehr polare oder thermisch labile Verbindungen können nur nach vorheriger Derivatisierung gaschromatographisch analysiert werden.

Ausführliche Erläuterungen und Beschreibungen der Theorie und Anwendung der GC sind u. a. in einigen Übersichtsarbeiten zu finden [SCHOMBURG 1987; GROB 1985; GOTTWALD 1995].

Die Kombination des gaschromatographischen Trennverfahrens mit einem empfindlichen und spezifischen Detektor macht es möglich, die Komponenten qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Voraussetzung ist die Erzeugung eines der Substanzmenge der getrennten Komponenten einer Mischung proportionalen Signals durch den Detektor. Da in der vorliegenden Arbeit die Massenspektrometrie als Detektionsmethode gewählt wurde, wird im Folgenden darauf genauer eingegangen. Zusätzlich

² Mit der Gesamttrennstufenzahl ist die Zahl der theoretischen Böden einer Säule gemeint, auf denen sich das Verteilungsgleichgewicht zwischen stationärer und mobiler Phase einstellt.

wurde zur Überprüfung der Effizienz der Derivatisierungsmethode der element-spezifische Atomemissionsdetektor (AED) eingesetzt (s. Kapitel 2.5.1.2).

2.5.1.1 Massenspektrometrische Detektion

Die Massenspektrometrie (MS) stellt eine wertvolle Ergänzung zur Infrarotspektroskopie (IR), Kernresonanzspektroskopie (NMR) und Röntgenstrukturanalyse (XRD) bei der chemischen Strukturaufklärung dar. Ihr Erfolg beruht in erster Linie auf der einfach realisierbaren Kopplung mit der GC. In Verbindung mit deren hoher Trenneffizienz kommt die Sensitivität und Spezifität des Detektors sehr gut zum Tragen. Außerdem ist der massenspektrometrische Detektor (MSD) sehr flexibel, da die Spezifität dem zu lösenden analytischen Problem angepaßt werden kann.

Die Erzeugung der charakteristischen Massenspektren erfolgt im Wesentlichen in drei Prozessen (Vgl. auch Schema in Abb. 2.2):

- *Ionisierung* neutraler Probenmoleküle mit nachfolgendem Zerfall der Primärionen
- *Massentrennung* der Primär- und Fragmentionen
- Verstärkung und Registrierung während der *Detektion*

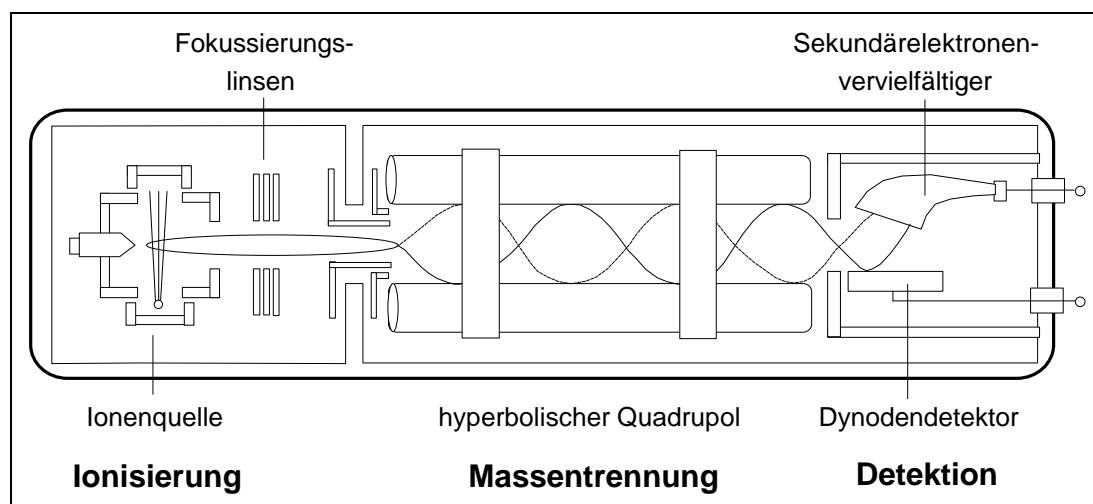


Abb. 2.2: Schema eines Massenspektrometers nach [MCLAFFERTY & TURECEK 1995]

Für die Erzeugung der Ionen in der Ionenquelle wurde in dieser Arbeit die Elektronenionisierung (*Electron impact*; EI) eingesetzt. Die Ionen werden dabei mit Hilfe eines hochenergetischen Elektronenstrahls erzeugt, der von einer Glühkatode emittiert und quer durch die Ionenquelle zur Anode hin beschleunigt wird. Die Elektronen (70 eV) stoßen auf ihrem Weg senkrecht auf den gasförmigen Teilchenstrom der Probenmoleküle, der bei einem Druck von ca. 10^{-5} Torr in die Ionenquelle eintritt. Es entstehen

zunächst positiv geladene Radikationen, die aufgrund ihrer hohen Energie sofort fragmentieren. Diese Ionisierungsart liefert gut reproduzierbare Massenspektren, da bei jeder Substanz charakteristische Fragmentierungsmuster entstehen. Andere Ionisierungsarten sind die chemische Ionisierung (CI), die ebenfalls nur für bereits gasförmige Verbindungen geeignet ist, das Fast Atom Bombardment (FAB), die Elektrospray Ionisierung (ESI) und die Desorptionsionisierung (DI) für nicht flüchtige Stoffe [BUSCH 1995; GOHEEN et al. 1997].

Die in der Ionenquelle entstandenen Ionen werden durch die Ziehspannung der Anode aus der Quelle herausgezogen, beschleunigt und in die Massenanalysator-Einheit (hier Quadrupol) geleitet. Der Ionenstrahl bewegt sich dabei in Längsrichtung zwischen vier parallelen Stäben auf den Detektor zu. Die Massentrennung aufgrund des Masse-Ladungs-Verhältnisses (m/z) erfolgt durch die Kombination von Radiofrequenzen (RF) und Gleichstrom mit entgegengesetzter Polarität der gegenüberliegenden Stabpaare. Durch das wechselnde RF-Feld bewegen sich die Ionen auf spiralförmigen Bahnen zwischen den Stäben und nur die Ionen, die das eingestellte m/z -Verhältnis aufweisen, gelangen durch einen Kollektorspalt zum Detektor. Alle anderen Ionen werden durch Ablenkungen im Feld herausgefiltert. Bei der Messung im Full Scan Modus wird ein festgelegter Massenbereich durch Veränderung der Felder und Einstellungen der m/z -Verhältnisse zyklisch vermessen. Durch die Möglichkeit im SIM-Modus (*selected ion monitoring*) einzelne spezifische Massen zu detektieren, kann die Empfindlichkeit enorm erhöht werden [MCLAFFERTY, TURECEK 1995; BUDZIKIEWICZ 1992; SCHMID 1990].

Die Detektion und Verstärkung der getrennten positiv geladenen Ionen erfolgt durch Neutralisation der Ionenladung beim Auftreffen auf den Dynodendetektor. Dabei wird ein Elektronenstrom erzeugt, der der Zahl der eintreffenden Ionen proportional ist und durch den Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) registriert und kaskadenartig verstärkt wird. Die computergestützte Datenaufnahme zeichnet die Intensitäten aller Ionen auf und liefert durch Summieren der Ionenintensitäten das Totalionenstrom-chromatogramm (*total ion current*; TIC-Chromatogramm).

Für die Vergleichbarkeit von Massenspektren ist eine regelmäßige Kalibrierung des Gerätes unerlässlich. Die Kalibrierung des in der Arbeit verwendeten HP 5989 A-Massenspektrometers (MS-Engine) von Hewlett Packard erfolgte über ein Kalibriermakro (Autotune).

2.5.1.2 Atomemissionsdetektion

Bei der Atomemissionsdetektion werden die gaschromatographisch getrennten Substanzen durch ein mikrowellen-induziertes Plasma (MIP) aus Helium atomisiert. Das Plasma erreicht dabei Temperaturen bis zu 3000 °C.

Der von der Kapillarsäule kommende Gasstrom gelangt zunächst durch eine beheizte Transferline in das Entladungsröhrchen, welches sich in einem ebenfalls beheizten Cavity-Block befindet. Im Entladungsröhrchen befindet sich der Plasmaraum in den zur Aufrechterhaltung des Plasmas ein Make-up Gas aus Helium zugeführt wird. Eine unter dem Entladungsröhrchen befindliche Antenne empfängt über einen Führungskanal die vom Mikrowellengenerator als stehende Welle ausgesendeten Mikrowellen. Mit Hilfe eines Zündfunken lässt sich das Plasma durch die Mikrowellen (2,45 GHz, 50 W) zünden [UDEN 1995]. Die verwendete modifizierte Cavity nach Beenakker [BEENAKKER 1976] ermöglicht die Erhaltung des Heliumplasmas unter Atmosphärendruck und erfordert gleichzeitig weniger Mikrowellenleistung als andere Verfahren. Weiterhin wird eine Umkehr der Gasflüsse ermöglicht, wodurch das Lösungsmittel vor dem Plasma ausgeblendet werden kann. Gelangt Lösungsmittel (1 µl genügen) in den Plasmaraum führt dies zu Carbonisierungen der Innenwände des Entladungsröhrchens bzw. sogar zum Erlöschen des Plasmas.

Durch die Kollision der Probenmoleküle mit metastabilen Bestandteilen des Plasmas wird bei den vorherrschenden hohen Temperaturen genügend Energie übertragen, um die Probenmoleküle zunächst zu atomisieren und die entstandenen Atome im weiteren Verlauf anzuregen [LINKERHÄGNER 1994]. Die angeregten Atome emittieren durch die Rückkehr ihrer Elektronen in den energieärmeren Zustand charakteristische Linienspektren, die detektiert und zur Auswertung herangezogen werden. Durch ein Quarzfenster zwischen Entladungsröhrchen und Spektrometerraum fällt das emittierte Licht auf einen elliptischen Spiegel, der das gebündelte Licht über einen Fokussierungsspalt auf das holographische Gitter umlenkt. Hier wird das Licht in seine Wellenlängen zerlegt und durch einen Photodiodenarray (PDA) registriert. Eine hohe Auflösung des PDA von unter 0,2 nm ist erforderlich, da viele der intensivsten Emissionslinien der Elemente sehr dicht zusammen liegen. Durch insgesamt 211 Photodioden die mit Hilfe eines Schrittmotors beweglich in der Fokusebene angeordnet sind, werden ca. 50 nm des Gesamtemissionspektrums aufgezeichnet.

Die Zuführung von Reaktandgasen wie Sauerstoff oder Wasserstoff verhindert zu starke Kohlenstoffablagerungen an den Innenwänden des Entladungsröhrchens und erhöht gleichzeitig die Empfindlichkeit der Messung einiger Elemente.

2.5.2 Derivatisierung von organischen Säuren und Aminosäuren

Die Derivatisierung von Verbindungen im allgemeinen wird aus unterschiedlichen Zielsetzungen bzw. Problemstellungen heraus durchgeführt (siehe Kap. 2.4). Im Wesentlichen sind dies die Erhöhung der Flüchtigkeit, die Verbesserung der thermischen Stabilität insbesondere bei der GC oder eine empfindlichere Detektion.

Sollen organische Säuren und Aminosäuren gaschromatographisch getrennt werden, müssen die funktionellen Gruppen im Molekül zunächst durch Derivatisierung maskiert werden. Ohne Derivatisierung wären diese polaren, thermisch labilen Verbindungen der GC nicht zugänglich. Zur Derivatisierung von Säure- und Hydroxylgruppen wird häufig das Methylierungsverfahren mit Diazomethan nach [SCHLENK & GELLERMANN 1960] angewandt. Aber auch andere Alkylierungs- und Silylierungsmethoden [BLAU, HALKET 1993] werden eingesetzt.

Derivatisierungen hinsichtlich der HPLC beabsichtigen die Einführung chromophorer oder fluoreszierender Gruppen oder die Trennung an chiralen Säulen.

In Tabelle 2.1 sind einige Derivatisierungsreagenzien zusammengestellt, mit deren Hilfe organische Säuren und Aminosäuren der GC oder HPLC zugänglich gemacht werden können. Detaillierte Beschreibungen und Reaktionsbedingungen sind in der angegebenen Literatur zu finden.

Tabelle 2.1: Derivatisierungsreagenzien für NH-, OH-, oder COOH-Gruppen

Gaschromatographie	Literatur
Trimethylaniliniumhydroxid (TMAH)	[SCHULTEN & SORGE 1995]
Diazomethan	[PINKSTON et al. 1981]
Trimethylsulfoniumhydroxid	[ZAPF 1998]
Fluoressigsäureanhydride (TFAA, PFPA, HFBA)	[ZUMWALT et al. 1987]
Isothiocyanate (BITC, BZITC)	[WOO et al. 1996; WOO & AHAN 1996]
Chloroformate	[HUSEK 1992; BUTZ & STAN 1993; VATANKHAH & MOINI 1994; PAN et al. 1997; PIETSCH et al. 1996]

<i>Flüssigchromatographie</i>	Literatur
ortho-Phthalaldehyd (OPA)	[GODEL et al. 1992; BRÜCKNER et al. 1995]
9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC)	[EINARSSON & JOSEFSSON 1987; KIRSCHBAUM et al. 1994; CARRATU et al. 1995]
Dabsylchlorid	[KRAUSE et al. 1995; WU & TONG 1998]
Aminoadamantan	[GUSTAVSSON & BETNER 1990]

Die meisten Derivatisierungsmethoden für die GC setzen die vorherige Extraktion der Analyten mit Hilfe organischer Lösungsmittel voraus, da die Reagenzien in wäßrigen Medien nicht beständig sind.

Durch die Arbeiten von Husek [HUSEK 1990; 1991 a und b; 1992; 1993] haben die Chloroformate für die Derivatisierung von Fettsäuren, Hydroxycarbonsäuren und Aminosäuren in wäßrigen Medien wieder Bedeutung erlangt.

Die Derivatisierungsmethode nach Husek ist einfach und schnell. Säuren werden in einem Reaktionsgemisch mit Acetonitril, Alkohol, Pyridin und Wasser verestert und mit Hilfe eines organischen Lösungsmittels extrahiert. Allerdings gelingt es nicht Hydroxylgruppen in β -Position zur Carboxylgruppe wie z. B bei Serin und Threonin umzusetzen [HUSEK 1991 b]. Ebenso ist die Reaktion nur mit einem Anteil organischer Lösungsmittel, also nicht direkt in Wasser möglich.

Bei der in dieser Arbeit entwickelten Derivatisierung gelang dies jedoch durch die in-situ Umsetzung mit Butylchloroformat (BCF). Die Methode und ihre Vorteile gegenüber anderen Derivatisierungen werden im Kapitel 4.1 beschrieben.

3 Problemstellung und Ziel

Der Fruchtsaftanalytik stehen zur Zeit viele zum Teil sehr aufwendige und kostspielige Verfahren zur Verfügung, mit deren Hilfe Verfälschungen erkannt und die Reinheit bzw. Authentizität von Fruchtsäften geprüft werden können. In dieser Arbeit soll eine in-situ Derivatisierung mit anschließender GC – MS - Messung erarbeitet werden, die einen schnellen und einfachen Nachweis von Fruchtsäuren und Aminosäuren in Fruchtsäften und damit deren Prüfung auf Authentizität erlaubt.

Herkömmliche Methoden können die polaren Frucht- und Aminosäuren nur getrennt erfassen und es sind mehrere Untersuchungen notwendig, um genügend Informationen über diese Inhaltsstoffe zu erhalten. Mit dieser Arbeit soll gezeigt werden, daß die simultane Bestimmung beider Verbindungsklassen gegenüber herkömmlichen Methoden möglich ist. Das spart Zeit und Arbeit, da Fruchtsäure – Aminosäure – Fingerprints aufgenommen werden. Es soll gezeigt werden, daß deren Informationsgehalt ausreicht, Apfelsaftverfälschungen mit artfremden Säften aufzudecken.

Qualitative Untersuchungen verschiedener Fruchtarten sollen zeigen, daß die Chromatogramme artspezifische Fingerprints darstellen, die für die Charakterisierung herangezogen werden können.

Bisher wurden Fruchtsäuren lediglich über Richtlinien und Grenzwerte und die Aminosäuren nur in weiterführenden Analysen zur Beurteilung einzelner Fruchtarten herangezogen. Am Beispiel von Apfelsaft soll ein Verfahren entwickelt werden, welches die Vorteile der Fingerprintverfahren nutzt und die arttypischen Muster des Fingerprints erkennt und auf Abweichungen hinweist.

Diese Methode soll ein Screeningverfahren für Apfelsäfte umfassen, das es ermöglicht, abweichende Proben herauszufiltern, die anschließend durch aufwendigere Methoden überprüft werden können.

Das Screening soll die Möglichkeit bieten, Verfälschungen von Apfelsaft mit artfremden Säften oder mikrobielle Veränderungen des Saftes zu erkennen und in der Routineanalytik Kosten und Zeit zu sparen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 *Entwicklung der in-situ Derivatisierung mit Butylchloroformat (BCF)*

4.1.1 In-situ Derivatisierung

Die gaschromatographische Analyse der sehr polaren Frucht- und Aminosäuren ist, wie schon eingehend in Kap. 2.4 erläutert wurde, problematisch, da die Verbindungen einerseits sehr schlecht mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden können und andererseits die meisten Derivatisierungsreagenzien in Wasser instabil sind. Da der schnelle und einfache Nachweis sehr polarer Verbindungen nicht nur für die Analytik von Lebensmitteln, sondern auch in der Umwelt und Medizin von Interesse ist, sind in den letzten Jahren Derivatisierungsmethoden entwickelt worden, die eine in-situ Umsetzung der Analyten erlauben. Als Beispiel sei hier die Methylierung von halogenierter Essigsäure mit Dimethylsulfat und einem Ionenpaar-Modifizier [NEITZEL et al. 1998] genannt oder in-situ Derivatisierungen von organischen Säuren während der Extraktion mit überkritischem Kohlendioxid [CUMMINS & WELLS 1997; BARDEN et al. 1997; FIELD & MONOHAN 1995]. Vincenti und Minero stellen in ihren Arbeiten [MINERO et al. 1994; VINCENTI et al. 1995] eine in-situ Derivatisierung mit Hexylchloroformat vor, die die Umsetzung einer Reihe sehr polarer Verbindungen in Gegenwart von Pyridin ermöglicht. Es entstehen jedoch sehr viele Nebenprodukte, die die Auswertung matrixreicher Proben erschweren.

In der vorliegenden Arbeit wird eine in-situ Derivatisierung mit Butylchloroformat basierend auf der Methode von Vincenti und Minero vorgestellt, die in der Lage ist, organische Säuren und Aminosäuren gemeinsam zu bestimmen. Die Umsetzung findet im Ultraschallbad statt, wodurch eine schnelle und sehr gute Durchmischung der Reaktionspartner und ein für die Reaktion notwendiger Energieeintrag gewährleistet ist. Eine vorherige Probenaufarbeitung wie Extraktion und/oder clean up ist nicht notwendig, so daß der zeitliche Aufwand für die Derivatisierung nur wenige Minuten beansprucht. Die Carbonsäuregruppen werden durch die Reaktion in Butylester, Hydroxylgruppen in Butylcarbonate und Aminogruppen in Butylcarbamate überführt. Die Derivate sind ausreichend unpolar, so daß sie problemlos mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert und der Gaschromatographie zugänglich gemacht werden können.

In Abb. 4.1 ist die zugrunde liegende chemische Reaktion der Derivatisierung dargestellt.

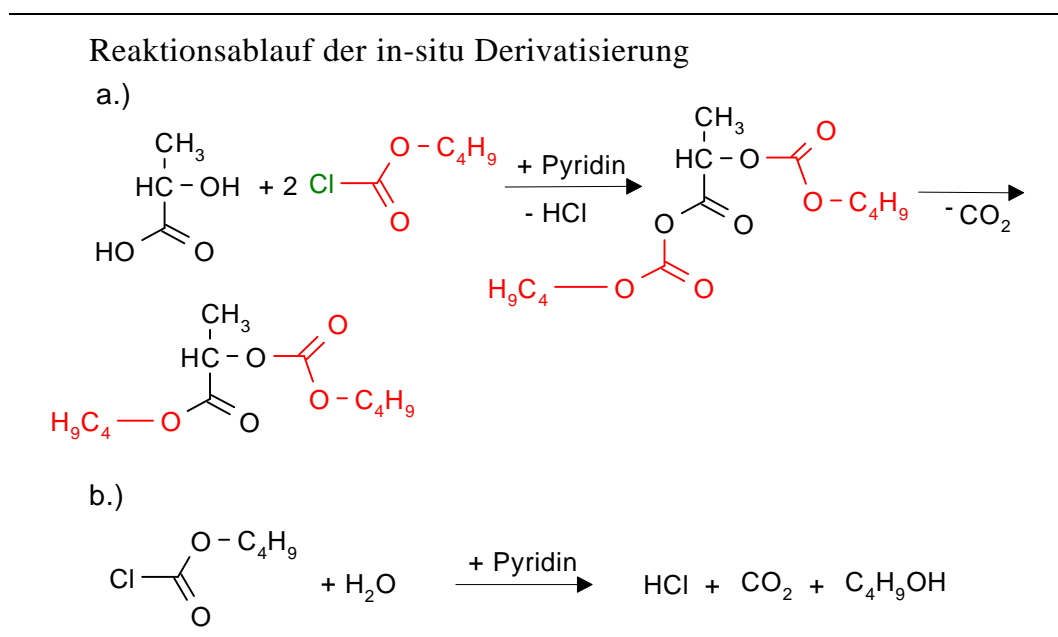


Abb. 4.1: Reaktionsablauf der in-situ Derivatisierung mit Butylchloroformat am Beispiel der Milchsäure
 a.) Derivatisierung der Milchsäure
 b.) Zerfall des Butylchloroformats in Wasser

Die bei der Reaktion zu beobachtende Gasbildung ist zum einen auf die Entstehung von CO_2 aufgrund der Bildung des Butylesters durch Decarboxylierung zurückzuführen, und zum anderen auf den teilweisen Zerfall des Derivatisierungsreagens durch Hydrolyse (siehe Abb. 4.1,b.)) [HUSEK 1992; BUTZ 1994]. Damit ist auch die Gasbildung beim Blindversuch in reinem Wasser erklärbar.

4.1.2 Modifizierung der in-situ Derivatisierung

Ausgehend von den Arbeiten von MINERO et al. 1994 und VINCENTI et al. 1995 wurden die für die Bestimmung von Frucht- und Aminosäuren optimalen Reaktionsbedingungen ermittelt. Dafür wurden Standardverbindungen gewählt, die das Spektrum der in Fruchtsaft vorkommenden Säuren repräsentieren. Dazu gehören:

- Monocarbon- und Hydroxycarbonsäuren (Milch- und Glycolsäure),
- Dicarbon- und Hydroxydicarbonsäuren (Citronen- und Äpfelsäure),
- Aromatische Säuren (Benzoesäure) und
- Aminosäuren (Glycin, Valin, Lysin, Tryptophan)

4.1.2.1 Wahl des Derivatisierungsreagenzes

Zunächst wurde die Derivatisierung, wie in der Literatur beschrieben (Arbeitsvorschrift siehe Anhang C), mit Hexylchloroformat (HCF) und anschließend mit kürzerkettigen Chloroformaten durchgeführt und verglichen (siehe Abb. 4.2).

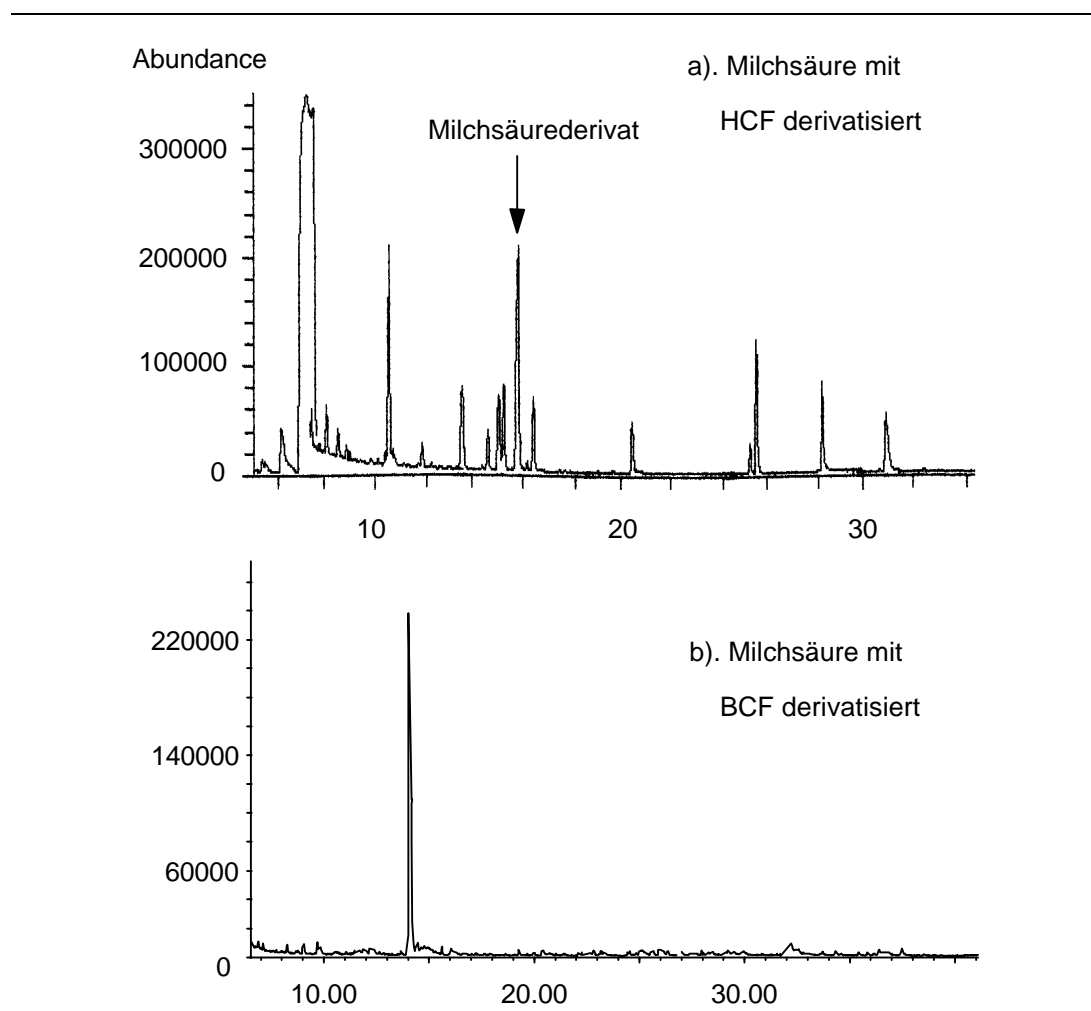


Abb. 4.2: TIC der Milchsäurederivate mit a.) Hexylchloroformat
b.) Butylchloroformat (GC-MS-Bedingungen siehe Anhang B)

Für den Vergleich waren Ethyl-, Methyl- und Butylchloroformat interessant, da diese Reagenzien bereits erfolgreich in wässrigem Milieu eingesetzt wurden [HUSEK 1992; BUTZ 1994]. Ethyl- und Methylchloroformat führten unter in-situ Bedingungen jedoch nicht zum Erfolg. Es wird angenommen, daß sie in Wasser zu schnell hydrolysieren und nicht alle funktionellen Gruppen umgesetzt werden können. Eventuell gebildete Derivate sind dann noch zu polar und ihre Extraktion in organische Lösungsmittel ist unzureichend [MINERO et al. 1994].

Die Derivatisierung mit BCF ist hingegen, wie Abb. 4.2 b zeigt, sehr zufriedenstellend und zeichnet sich gegenüber der mit HCF durch deutlich weniger Nebenprodukte und kürzere Retentionszeiten aus. Letzteres ist insbesondere bei den großen unpolaren Derivaten z.B. von Weinsäure oder Tyrosin vorteilhaft, da so die Zeit für die GC stark verkürzt werden kann (<1 h) und eine bessere Chromatographie erreicht wird. Mit BCF entsteht bei den Testverbindungen jeweils nur ein Produkt, bei dem alle funktionellen Gruppen umgesetzt werden. Dies ist bei der Analyse mehrerer Säuren, wie sie im Fruchtsaft zu erwarten sind, sehr wichtig. Für die Bestimmung von Frucht- und Aminosäuren ist BCF aufgrund der aufgeführten Vorteile am besten geeignet.

4.1.2.2 Wahl des Extraktionsmittels

In der ursprünglichen Methode ist für die Extraktion der Hexylderivate Hexan als Lösungsmittel verwendet worden. Da die mit BCF entstehenden Derivate polarer sind, sollen der Extraktion mit Hexan die mit Toluol bzw. Ethylacetat gegenübergestellt werden (Abb. 4.3).

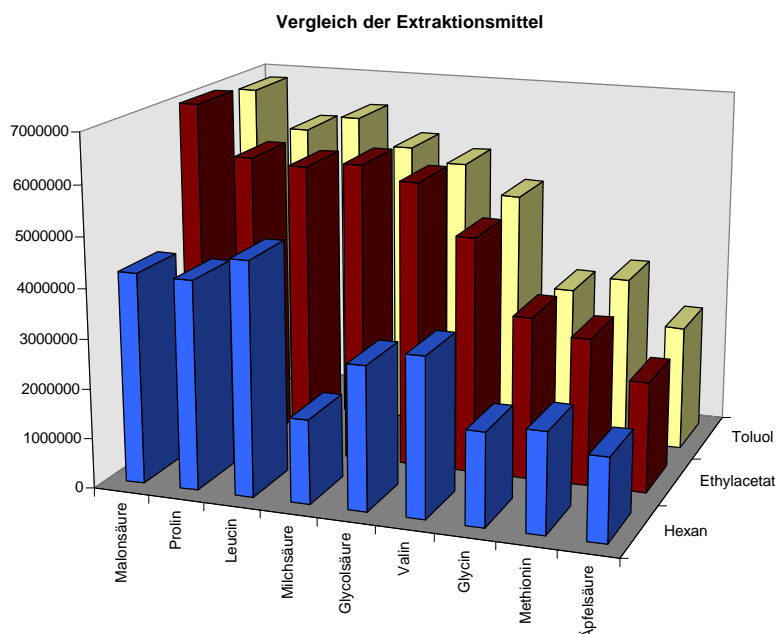


Abb. 4.3: Vergleich der Extraktionsmittel Toluol, Ethylacetat und Hexan über die mittleren Peakflächen der Verbindungen des TIC-Chromatogrammes

Durch die unterschiedliche Polarität der gewählten Lösungsmittel sollte eine Steigerung der Extraktionsausbeute überprüft werden. Wie erwartet, ist sowohl mit Toluol als auch mit Ethylacetat eine deutliche Verbesserung der Extraktion der Verbindungen zu verzeichnen. Mit Ethylacetat werden gegenüber Toluol wiederum die polaren Verbin-

dungen Malon-, Milch- und Glycolsäure besser extrahiert. Die Unterschiede sind aber unerheblich und gleichen sich durch die schlechtere Extraktion unpolarer Verbindungen wieder aus. Toluol erweist sich im Vergleich zu Ethylacetat als geeigneter, da die Flüchtigkeit von Toluol und damit Verluste durch Verdunstung geringer sind. Im Hinblick auf eine Automatisierung und der damit verbundenen längeren Standzeiten der GC-Vials auf dem Autosampler ist Toluol vorteilhafter.

4.1.2.3 Variation weiterer Parameter

Im weiteren Verlauf der Optimierung wurden die Mengen des Derivatisierungsreagens und des Katalysators variiert. Eine optimale Menge beider Parameter für *alle* untersuchten Frucht- und Aminosäuren konnte durch die Änderungen der zugesetzten Volumina jedoch nicht ermittelt werden. Für die Einzelanalyse von Säuren könnten möglicherweise durch Variation der Reagenzienanteile optimale Bedingungen eingestellt und dadurch höhere Umsätze erreicht werden.

Bei der Summenerfassung aller Säuren sollten die Volumina so gewählt werden, daß das Reagenz im Überschuß vorliegt.

4.1.3 Untersuchung der Umsatzrate bei der Derivatisierung mittels Atomemissionsdetektion

Die Umsetzung der Säuren und Aminosäuren mit BCF führt zu Derivaten, deren Referenzsubstanzen kommerziell nicht erhältlich sind. Daher ist eine direkte Beurteilung der tatsächlichen Umsatzrate der jeweiligen Ausgangsverbindung nicht möglich. Um dennoch eine Aussage über die Umsatzrate der Derivatisierung einschließlich Extraktion machen zu können, wurde der indirekte Weg über die Detektion des Kohlenstoffs der Verbindungen gewählt.

Mit dem AED steht ein elementspezifischer Detektor zur Verfügung (Kap. 2.5.1.2), der die Möglichkeit zur Berechnung von Elementverhältnissen bzw. Summenformeln bietet [LINKERHÄGNER 1994; SULLIVAN & QUIMBY 1989; GURKA et al. 1997]. Ebenso wurde der AED bei der universellen Kalibrierung von Alkylethoxylaten eingesetzt [ASMUSSEN & STAN 1998], wobei die Elementspuren von Kohlenstoff, Sauerstoff und Silizium genutzt wurden.

Die Derivate einiger Verbindungen wurden daher nach gaschromatographischer Auftrennung mit dem AED in der Kohlenstoffspur bei 193 nm detektiert und der Elementresponse zur Berechnung der Umsatzrate herangezogen. Die Kalibrierung des AED erfolgte indirekt über die Butylester von Bernstein-, Malein- und Benzoessäure in

verschiedenen Konzentrationen (1-50 mg/L). Es wurden bewußt Eichsubstanzen gewählt, die nicht zu einer homologen Reihe gehören, um den Einfluß der unterschiedlichen Strukturen und des Sauerstoffanteiles im Molekül auf den Kohlenstoffresponse zu überprüfen. In der Literatur [WYLIE et al. 1990; WEBSTER & COOKE 1995; PEDERSEN-BJERGAARD et al. 1992 b; ASP et al. 1996] werden verschiedene Einflüsse der Molekülstruktur auf den Elementresponse beschrieben. Die Unabhängigkeit des Kohlenstoffresponse von der molekularen Struktur der Verbindungen ist Voraussetzung für die Berechnung der strukturell sehr unterschiedlichen Frucht- und Aminosäuren.

Die Versuchsbeschreibung ist in Anhang C und die Gerätekonfigurationen des GC und AED sind in Anhang B zusammengestellt.

Die Berechnung der Umsatzrate erfolgt auf der Grundlage des Kohlenstoffresponse in den Eichsubstanzen und den Derivaten. Zunächst wird der relative molare Elementresponse pro Kohlenstoffatom für die Eichsubstanzen bestimmt, der nach [YIERU et al. 1990] folgendermaßen definiert ist:

$$\text{Elementresponse} = \frac{\text{Peakfläche}C}{\text{Konzentration}C} \quad \text{Gleichung (1)}$$

Für die Konzentration C gilt:

$$\text{Konzentration}C = \frac{\frac{M_C}{M_V} * \text{Konzentration}V}{\text{Atomgewicht}C} \quad \text{Gleichung (2)}$$

<i>Konzentration C:</i>	Kohlenstoffkonzentration in der Eichsubstanz [mmol/L]
<i>M_C:</i>	Molekulargewicht von Kohlenstoff in der Eichsubstanz [g/mol]
<i>M_V:</i>	Molekulargewicht der Eichsubstanz [g/mol]
<i>Konzentration V:</i>	Konzentration der Eichsubstanz in Wasser [mg/L]
<i>Atomgewicht C:</i>	Atomgewicht des Kohlenstoffs [mg/mmol]

Die Eichgerade (Abb. 4.4), die aus den drei verschiedenen Butylestern ermittelt wurde, weist eine sehr gute Linearität auf. Auf dieser Grundlage kann der Kohlenstoffresponse der Derivate ohne Zuhilfenahme von Originalreferenzen bestimmt und zur Berechnung der Umsatzraten herangezogen werden.

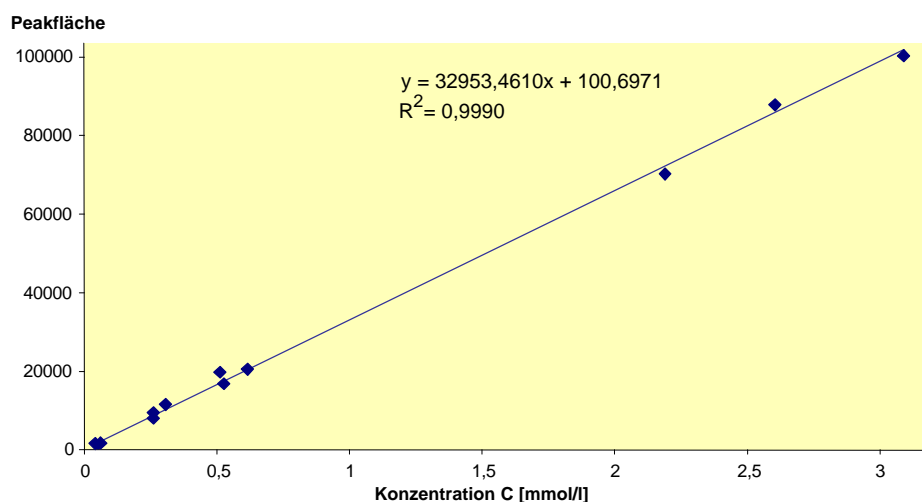


Abb. 4.4: Eichgerade ermittelt aus dem Kohlenstoffresponse der Butylester von Malein-, Bernstein- und Benzoesäure

Die Konzentration der Derivate bei einer theoretischen Umsetzung von 100 % wird zunächst aus der Konzentration der jeweiligen Säure berechnet:

$$\text{Konzentration } D = \frac{M_D * \text{Konzentration } S}{M_S} \quad \text{Gleichung (3)}$$

Konzentration D Konzentration des Derivates bei 100 % igem Umsatz

M_D : Molekulargewicht des Derivates [g/mol]

M_S : Molekulargewicht der Säure / Aminosäure [g/mol]

Konzentration S: Konzentration der Säure / Aminosäure [mg/L]

Aus dem Verhältnis der theoretisch berechneten Kohlenstoffmenge im Derivat bei 100 % iger Umsetzung und dem tatsächlich ermittelten Wert aus der indirekten Eichung ergibt sich die Umsatzrate (siehe Tabelle 4.1) für die jeweilige Verbindung.

Tabelle 4.1: Umsatzungsrate bei der Derivatisierung mit BCF anhand einiger Frucht- und Aminosäuren

Verbindung	Umsetzung [%]	Verbindung	Umsetzung [%]
Malonsäure	95	Isoleucin	85
Glycolsäure	30	Prolin	90
Milchsäure	20	Methionin	115
Bernsteinsäure	75	Äpfelsäure	75
Glycin	90	Phenylalanin	120
Alanin	100	Weinsäure	20
Lysin	95	Tryptophan	110

Die meisten der untersuchten Verbindungen werden mit 75-100 % gut bis sehr gut umgesetzt. Ausnahmen bilden die Hydroxysäuren Milch-, Glycol- und Weinsäure die lediglich zu 20 - 30 % umgesetzt werden, während für die Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Methionin zu hohe Werte ermittelt werden. Da der Einfluß der unterschiedlichen Struktur bzw. des Sauerstoffanteils im Molekül nicht signifikant ist, ist die Eichung für die unterschiedlichen Fruchtsäuren geeignet und die Werte der Umsetzung hinreichend genau.

Der Einfluß von Stickstoff auf den Kohlenstoffresponse konnte durch eigene Messungen nicht ermittelt werden. In der Literatur [PEDERSEN-BJERGAARD et al. 1992a] werden Erfahrungen auf dem Gebiet der Berechnung von empirischen Summenformeln beschrieben. Aus ihnen geht hervor, daß die Genauigkeit der Berechnungen um so größer ist, je besser Analyt und Bezugssubstanz übereinstimmen und der Response in Abhängigkeit vom Stickstoffanteil nicht linear ist. Daher ist es möglich, daß die hohen Werte für die Umsatzraten der Aminosäuren durch den Stickstoffeinfluß vorgetäuscht und Fehler zwischen 5 –15 % bewirkt werden [WYLIE et al 1990]. Daher können die berechneten Umsatzraten für die Aminosäuren nur als Abschätzung gewertet werden, sie sind möglicherweise geringer. Die Überbefunde von Phenylalanin, Methionin und Tryptophan weisen darauf hin.

4.1.4 Zusammenfassung

Die Variation der einzelnen Parameter ergab die in Abb. 4.5 dargestellte für Frucht- und Aminosäuren entwickelte Derivatisierungsvorschrift.

Durch die Wahl von Butylchloroformat als Derivatisierungsreagens und Toluol als Extraktionsmittel wurde die Derivatisierungsmethode in Hinblick auf die Bestimmung von Frucht- und Aminosäuren sowie hinsichtlich Standzeit der GC-vials und Analysenzeit während der GC verbessert. Unerwünschte Störpeaks im Chromatogramm wurden ebenfalls eliminiert.

Mit BCF entsteht aus den Verbindungen jeweils nur ein Derivat bei dem alle funktionellen Gruppen umgesetzt sind. Nur in wenigen Ausnahmen (z.B. Serin) werden auch Nebenprodukte, bei denen die Hydroxylgruppe nicht derivatisiert wurde, detektiert.

Aufgrund des breiten in Fruchtsaft zu erwartenden Substanzspektrums ist es nicht möglich, Reaktionsbedingungen zu schaffen, bei denen alle Substanzen optimal umgesetzt werden, was auch an den unterschiedlichen Umsatzraten deutlich wird.

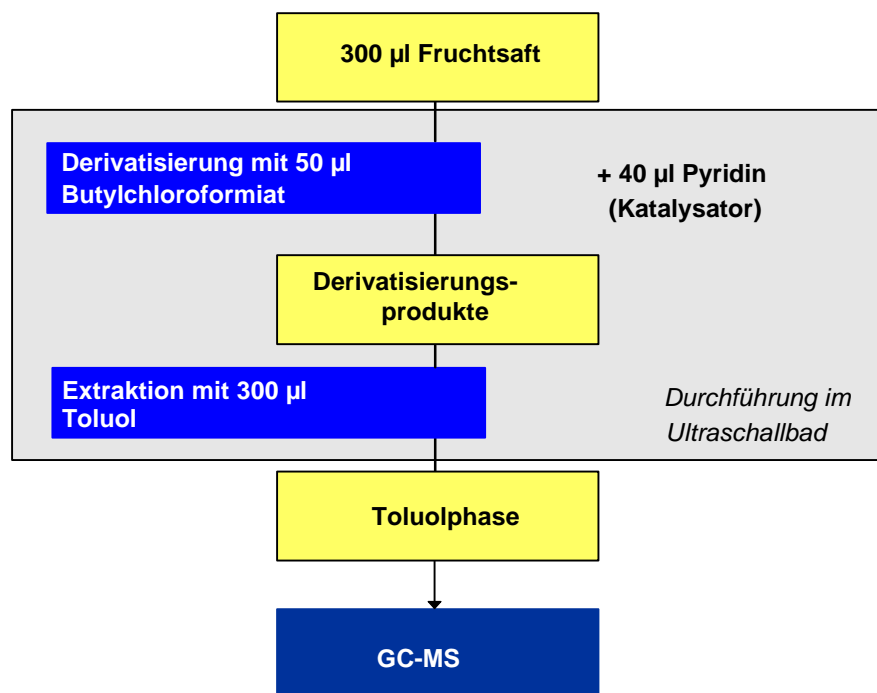


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der in-situ Derivatisierung von Frucht- und Aminosäuren in Fruchtsäften

Für den Fall, daß nur wenige oder einzelne Analyten bestimmt werden sollen, könnte durch Variation der Parameter eine weitere Verbesserung des Umsatzes der entsprechenden Verbindung erreicht werden.

Die Beurteilung der Umsetzung mit dem AED erscheint für die Fruchtsäuren sinnvoll, da die mit strukturell unterschiedlichen organischen Säuren aufgenommene Eichgerade eine sehr gute lineare Abhängigkeit aufweist. Der Einfluß des unterschiedlichen Sauerstoffanteils wird damit als nicht signifikant gewertet. Bei den Aminosäuren hingegen können die ermittelten Umsetzungen nur als Abschätzungen gewertet werden, da ein Einfluß des Stickstoffs auf den Kohlenstoffresponse aus der Literatur bekannt ist und hier nicht ausgeschlossen werden kann. Aus den Untersuchungen wird deutlich, daß die verschiedenen Substanzen unterschiedlich umgesetzt bzw. aus der wäßrigen Probe extrahiert werden und damit – wie im Verlauf der Arbeit noch deutlich gemacht wird – von der Peakfläche im TIC-Chromatogramm nicht direkt auf die Konzentration geschlossen werden kann.

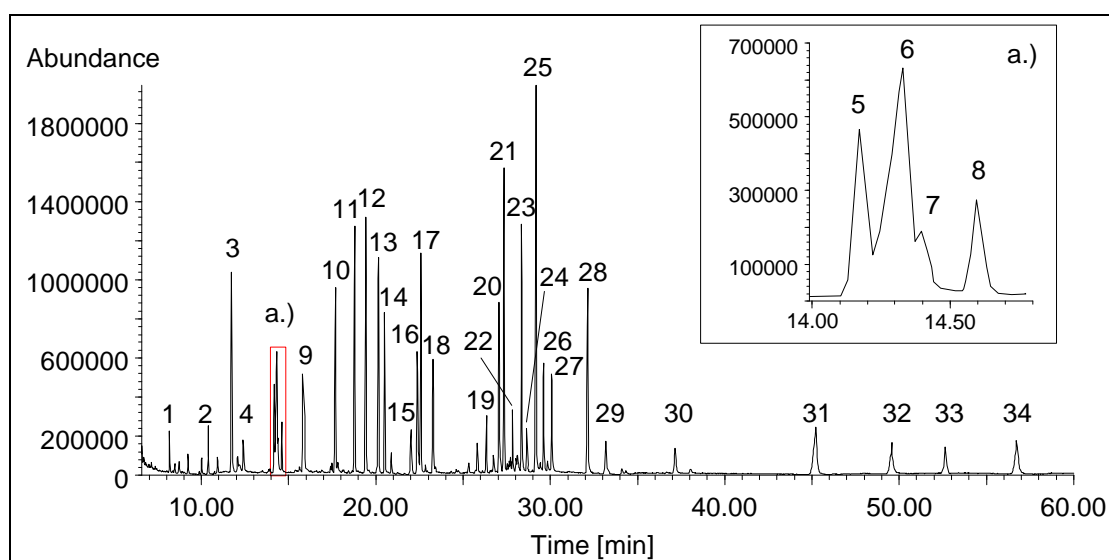
Mit der entwickelten in-situ Derivatisierung werden erstmals sowohl einfache Monocarbonsäuren und aromatische Säuren als auch Di- bzw. Tricarbonsäuren, Hydroxysäuren und Aminosäuren nebeneinander in Wasser erfaßt und der GC zugänglich gemacht.

4.2 GC-MS der Derivate

4.2.1 Detektion der Standardverbindungen

Für die Identifizierung der Frucht- und Aminosäurederivate in matrixreichen Proben wie Fruchtsäften, ist die Detektion mit dem MSD sehr gut geeignet. Der MSD liefert wie bereits erläutert (siehe Kap. 2.5.1.1) substanzspezifische Massenspektren, die mit Hilfe von Spektrenbibliotheken und der Retentionszeit eine eindeutige Identifizierung der Verbindungen erlauben.

Die Massenspektren der bei der Derivatisierung mit BCF entstehenden Derivate sind nur zum Teil in kommerziell erhältlichen Spektrenbibliotheken enthalten und es war notwendig, eine eigene Spektrenbibliothek anzulegen. Aus den in Fruchtsäften erwarteten Säuren und Aminosäuren ergab sich die Wahl der Standardverbindungen, die aus den Klassen der Carbonsäuren, Di-, und Tricarbonsäuren, Hydroxycarbonsäuren, aromatischen Säuren und Aminosäuren zusammengestellt wurden. Zusätzlich wurden Phenole, wie Hydroxyzimtsäuren untersucht, um weitere für die Beurteilung von Fruchtsäften wichtige Verbindungen [RAPISARDA et al. 1998; SHAHRZAD & BITSCH 1996] anhand ihrer Spektren erfassen zu können.



1 = Sorbinsäure, 2 = Benzoesäure, 3 = Malonsäure, 4 = Salicylsäure, 5 = Fumarsäure, 6 = Milch- und Glycolsäure, 7 = Bernsteinsäure, 8 = Maleinsäure, 9 = ISTD (Chlorbernsteinsäure), 10 = Glycin, 11 = Valin, 12 = Alanin, 13 = Leucin, 14 = Isoleucin, 15 = Threonin, 16 = γ -Aminobuttersäure, 17 = Prolin, 18 = Asparagin, 19 = Isocitronensäure, 20 = Äpfelsäure, 21 = Methionin, 22 = Citronensäure, 23 = Asparaginsäure, 24 = Stearinsäure, 25 = Phenylalanin, 26 = Serin, 27 = Glutaminsäure, 28 = ISTD (Chlorphenylalanin), 29 = Glutamin, 30 = Weinsäure, 31 = Lysin, 32 = Histidin, 33 = Tyrosin, 34 = Tryptophan

Abb. 4.6: TIC-Chromatogramm einer Standardmischung (10 mg/L je Substanz)
a.) vergrößerte Darstellung zwischen 14,0 und 14,8 min

In Abb. 4.6 ist das TIC-Chromatogramm einer Standardmischung aus 33 Frucht- und Aminosäuren und internen Standards dargestellt. Es wurde ein interner Standard für die Säuren (Chlorbernsteinsäure) und einer für die Aminosäuren (Chlorphenylalanin) verwendet.

Die Gerätekonfigurationen für die GC-MS sind im Anhang B, die Strukturformeln und Spektren der untersuchten Verbindungen bzw. deren Derivate im Anhang E zusammengestellt.

Nicht alle der untersuchten Standardverbindungen konnten mit BCF derivatisiert bzw. gaschromatographisch mit den gewählten Bedingungen erfaßt werden. In Tabelle 4.2 ist eine Übersicht aller untersuchten Verbindungen und die Ergebnisse der Untersuchungen aufgeführt.

Tabelle 4.2: Übersicht der mit BCF derivatisierten Verbindungen

Verbindung	Ergebnis	Verbindung	Ergebnis
Ameisensäure	-	Essigsäure	-
Stearinsäure	+	Malonsäure	+
Bernsteinsäure	+	Fumarsäure	+
Maleinsäure	+	Sorbinsäure	+
Glycolsäure	+	Milchsäure	+
Äpfelsäure	+	Citronensäure	+
			(ohne OH)
Weinsäure	+	Isocitronensäure	+
			(ohne OH)
Benzoessäure	+	Salicylsäure	+
Glycin	+	Valin	+
Alanin	+	Leucin	+
Isoleucin	+	Threonin	+
			(nur zwei Gruppen)
γ -Aminobuttersäure	+	Prolin	+
Glutaminsäure	+	Methionin	+
Asparaginsäure	+	Phenylalanin	+
Serin	+	Asparagin	+
	(zwei Prod.)		(ein NH nicht deriv.)
Lysin	+	Histidin	+
Arginin	-	Shikimisäure	-
Tryptophan	+	Tyrosin	+
Chinasäure	-	Galacturonsäure	-
Zimtsäure	+	Ascorbinsäure	-
Ferulasäure	+	p-Cumarsäure	+
	(zwei Prod.)		(zwei Prod.)
p-Hydroxybenzoesäureester	+	Vanillinsäure	+
			(zwei Prod.)

+ detektiert

- nicht detektiert

Die leicht flüchtigen Carbonsäuren wie Ameisen- und Essigsäure werden mit BCF theoretisch umgesetzt, sind aber offensichtlich zu flüchtig und werden mit Toluol und den daran gekoppelten Bedingungen für die GC nicht erfaßt. Weitere Säuren wie Ascorbinsäure, Shikimisäure oder Chinasäure werden ebenso wie die Aminosäure Arginin nicht erfaßt. Obwohl die letztgenannten Säuren für Fruchtsäfte wichtig sind [HERRMANN 1993; PÉREZ et al. 1997], ist das Substanzspektrum, von 33 Frucht- und Aminosäuren der mit BCF umgesetzten Verbindungen ausreichend groß, daß artspezifische Fingerprints zur Identifizierung von Säften zu erwarten sind. In der folgenden Aufstellung sind die 33 Frucht- und Aminosäuren, die in dieser Arbeit die Basis für die Beurteilung der Fruchtsäfte bilden, zusammengefaßt. Sie wurden bei allen Fruchtsaftanalysen untersucht.

Fruchtsäuren

Malonsäure, Stearinsäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure, Glycolsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Benzoesäure, Fumarsäure, Sorbinsäure, Milchsäure, Citronensäure, Salicylsäure, Isocitronensäure

Aminosäuren

Alanin, Valin, Glycin, Leucin, Isoleucin, Threonin, γ -Aminobuttersäure, Prolin, Asparagin, Methionin, Serin, Phenylalanin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Glutamin, Histidin, Lysin, Tyrosin, Tryptophan

4.2.2 Charakteristika der Massenspektren

Die Aufnahme und Interpretation der zahlreichen Massenspektren der untersuchten Verbindungen ergab einige charakteristische Merkmale beim Zerfall der Derivate während der Ionisierung im MSD. Dies ist eine wichtige Voraussetzung bei der Identifizierung bis dahin noch nicht erfaßter Verbindungen in Fruchtsäften. An den Derivaten von Äpfelsäure, Glycin und Benzoesäure sollen diese Merkmale herausgearbeitet werden.

Im Spektrum des Äpfelsäurederivates (Abb. 4.7) ist zu erkennen, daß Äpfelsäure mit BCF vollständig umgesetzt wurde. Sowohl die beiden Säurefunktionen als auch die Hydroxylgruppe sind derivatisiert. Das Molekülion fehlt im Spektrum stattdessen ist das $[M+1]$ -Ion, welches bei den meisten Fruchtsäuren beobachtet werden konnte, vorhanden. Ebenso typisch für die Derivate von Dicarbonsäuren und Hydroxysäuren ist

der Basepeak mit $m/z = 57$, er stammt aus dem Butylrest $[C_4H_9]$. Das Fragment $[(M+1)-56; C_4H_8]$ entsteht durch eine Umlagerung ähnlich der McLafferty-Umlagerung [McLAFFERTY & TURECEK 1995] aus den derivatisierten Säurefunktionen, das Fragment $[(M+1)-74; C_4H_9OH]$ entsteht ebenfalls aus den umgesetzten Säuregruppen. Das Ion mit $m/z = 246$ wird durch den Verlust von $[(M+1)-101; C_4H_9COO]$ aus dem Molekülion erzeugt und wird von der derivatisierten OH-Gruppe abgespalten.

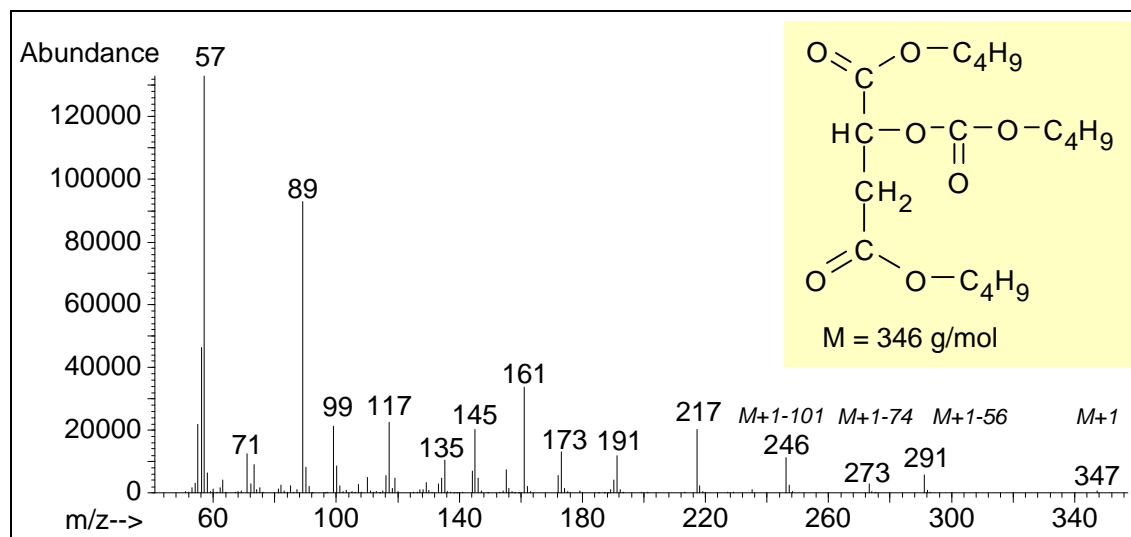


Abb. 4.7: Massenspektrum des Äpfelsäurebutylderivates

Für die vollständige Fragmentierung des Äpfelsäurederivates konnten zwei Mechanismen anhand des Spektrums nachvollzogen werden, womit sich die intensiven Peaks $[m/z = 291, 273, 246, 217, 191, 173, 161, 145, 117, 99, 89, 57]$ erklären lassen. Die wichtigsten Fragmente, die in fast allen untersuchten Spektren nachgewiesen wurden und ihre Herkunft wurden bereits beschrieben. Die Spektren der Säuren zeichnen sich durch eine starke Fragmentierung mit wenigen sehr intensiven Peaks aus.

Im Spektrum des Glycinderivates (Abb. 4.8) sind neben dem $[M+1]$ -Ion ebenfalls die Fragmente $[(M+1)-56]$ und $[(M+1)-74]$ aus dem Säurerest enthalten, außerdem ein Ion mit $m/z = 130$, welches aus dem Verlust von $[(M+1)-102; C_4H_9COOH]$ aus der Aminogruppe resultiert.

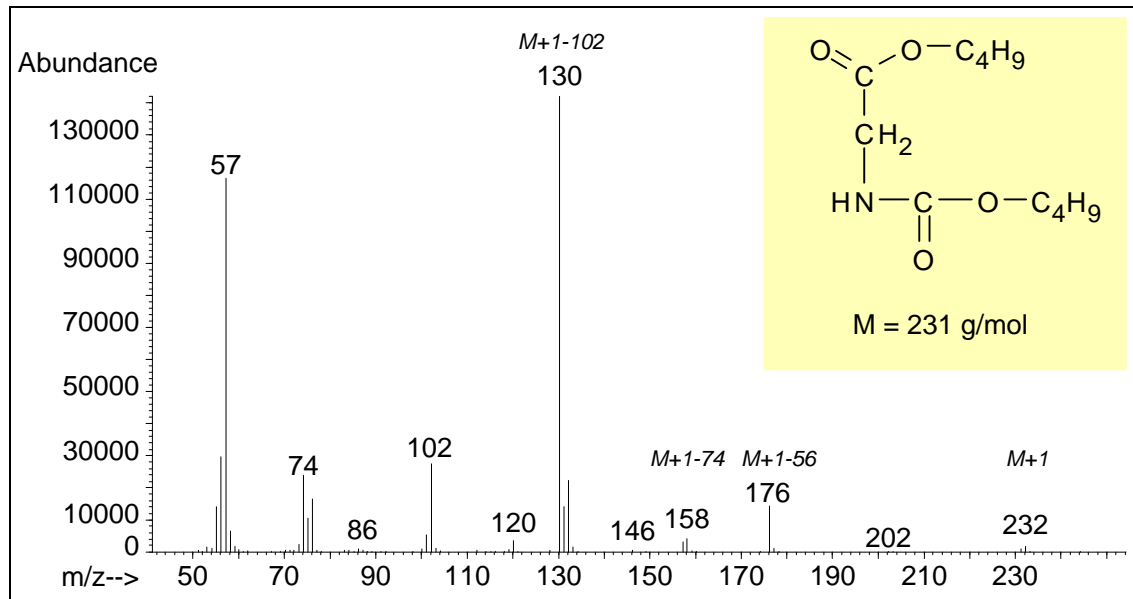


Abb. 4.8: Massenspektrum des Glycinbutylderivates

Der Peak mit $m/z = 57$ ist bei den Aminosäuren selten als Basepeak beobachtet worden, weist jedoch eine hohe Intensität auf. Der Basepeak ist eher für die jeweilige Aminosäure typisch und kein charakteristisches Merkmal für die Substanzklasse.

Im Spektrum des Benzoesäurederivates ist neben den typischen Fragmenten [M-55; M-73; M-101] das Molekölion [$m/z = 178$] und kein [M+1]-Ion zu erkennen (Abb. 4.9).

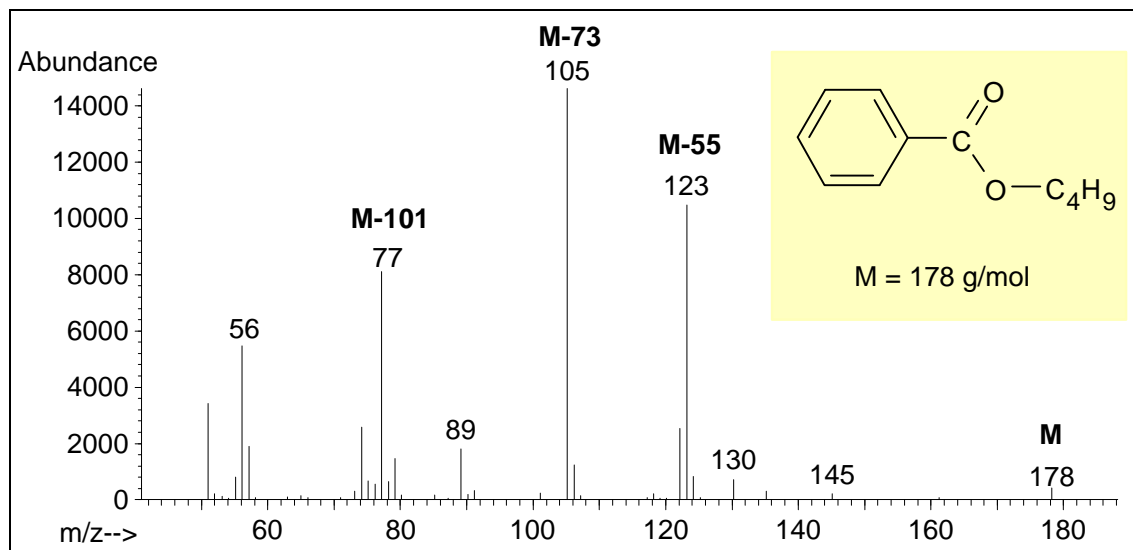


Abb. 4.9: Massenspektrum des Benzoesäurebutylderivates

Weiterhin typisch für die untersuchten aromatischen Verbindungen, ist der kleine Peak mit $m/z = 57$. Die intensivsten Peaks ergeben sich aus der aromatischen Struktur der

Verbindung wodurch die Spektren der Aromaten durch wenige aber intensive Peaks charakterisiert werden und leicht zu erkennen sind.

Die wichtigsten Fragmente der untersuchten Butyllderivate sind [M-55; M-100; M-101; M-73] bzw. durch Anlagerung eines Protons [(M+1)-56; (M+1)-101; (M+1)-102; (M+1)-74], sie sind in fast allen Spektren zu finden. Selbst wenn das Molekölion bzw. [M+1]-Ion fehlt, kann über diese typischen Fragmente auf die Struktur des Derivates und damit der ursprünglichen Verbindung zurückgeschlossen werden. So gelang es mit Hilfe dieser charakteristischen Merkmale, Verbindungen zu identifizieren und im Nachhinein durch Spektren der Referenzsubstanzen zu bestätigen.

4.2.3 Quantitative Bestimmung der Standardverbindungen

Nicht nur bei der Identifizierung der Verbindungen bietet der MSD Vorteile, sondern auch bei der Quantifizierung nicht vollständig getrennter oder durch Matrixpeaks überlagerter Substanzen. Am Beispiel der Standardverbindungen Fumar-, Milch-, Glycol- und Bernsteinsäure in Abb. 4.10 soll dies veranschaulicht werden.

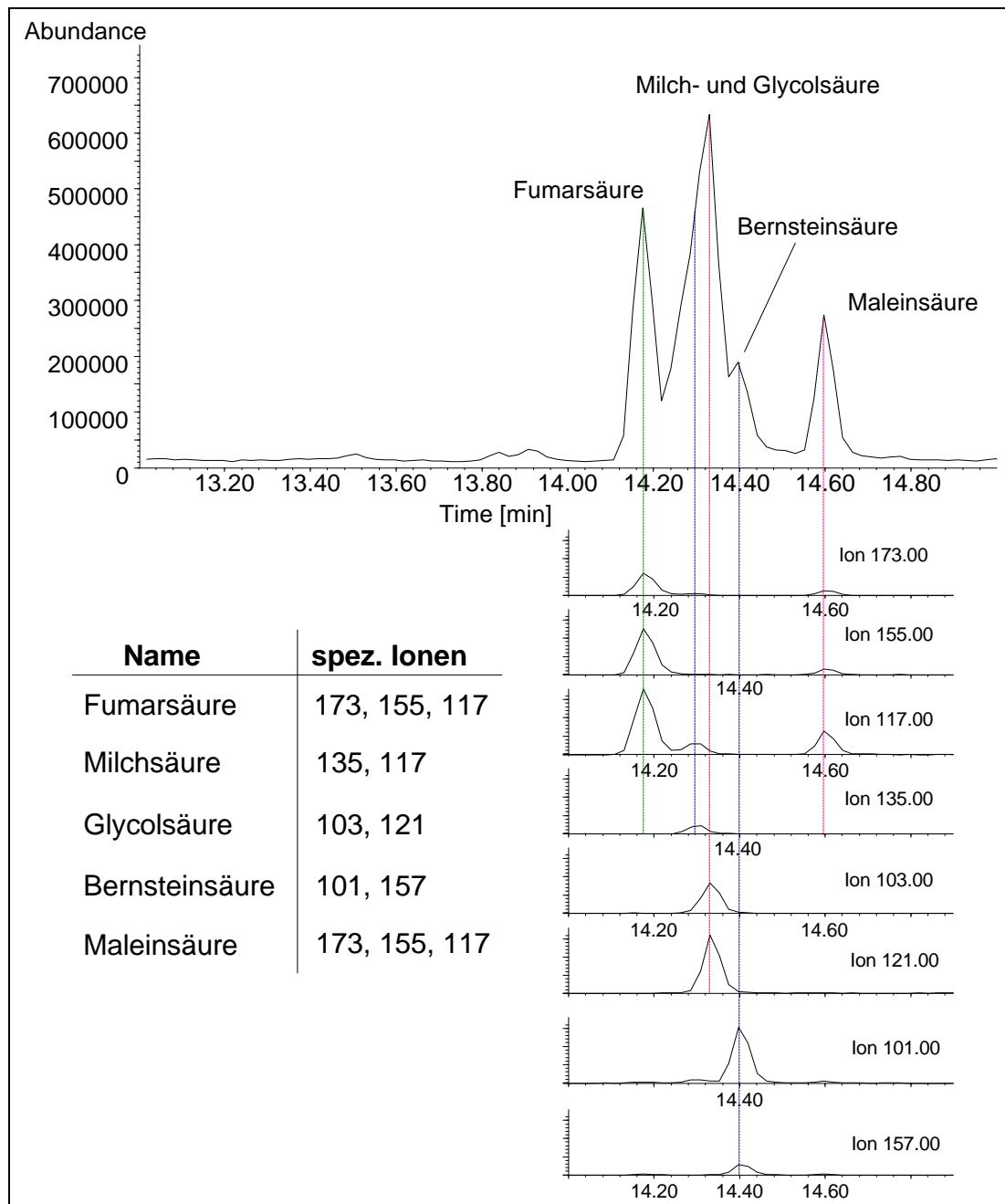


Abb. 4.10: Vergrößerung des TIC-Chromatogrammes zwischen 13,0 und 15,0 min und Ionenspuren der Derivate von Fumar-, Milch-, Glycol-, Bernstein- und Maleinsäure

Die Verbindungen eluieren zwischen 14,0 und 14,5 min, wobei Milchsäure und Glycolsäure fast gleichzeitig eluieren. Milchsäure ist maximal als Schulter in der vorderen Peakflanke zu erkennen. Ebenso wird Bernsteinsäure nicht vollständig von den beiden Säuren getrennt. Durch die Darstellung der Ionenspuren im unteren Teil der Abbildung wird sowohl eine Identifizierung als auch eine Quantifizierung möglich. Dazu wurden je Verbindung zwei bis drei charakteristische Ionen gewählt.

Auf diese Weise können auch Analyten, die von Matrixpeaks überlagert sind, erkannt und quantifiziert werden.

Für alle untersuchten Verbindung wurden drei signifikante Ionen gewählt, anhand derer die Quantifizierung im TIC-Chromatogramm durchgeführt wurde. Eines dieser Ionen oder ein zusätzliches Ion wird als Target-Ion definiert, über dessen Peakfläche die Quantifizierung erfolgt. Die Daten (Ionen, Retentionszeiten) der dafür ausgearbeiteten Methode sind im Anhang D tabellarisch zusammengefaßt. Die Methode erlaubt die automatisierte Auswertung der TIC-Chromatogramme, sie wird im Kapitel 4.5.2 noch ausführlicher dargestellt.

Die Quantifizierung der Frucht- und Aminosäuren erfolgte über Eichgeraden, in denen die über einen internen Standard (ISTD) normierten Peakflächen aufgetragen wurden. Da die Schwankungen der Säuren und der Aminosäuren unterschiedlich sind, waren zwei ISTD notwendig, um die Variationskoeffizienten (V_k) zu minimieren. Dazu wurde für die Säuren Chlorbernsteinsäure als ISTD und für die Aminosäuren Chlorphenylalanin verwendet.

Im Fruchtsaft sind je nach Verbindung und Art des Saftes große Konzentrationsunterschiede von wenigen mg/L der einen Säure bis zu einigen g/L einer anderen Säure zu erwarten. Es wurden Kalibrierkurven zwischen 1,0 bis 1000 mg/L aufgenommen. In dem gemessenen Konzentrationsbereich nimmt die Steigung der Kalibrierkurven im Bereich höherer Konzentrationen ab und ist damit nicht mehr linear. Für die Quantifizierung wurden zwei Eichgeraden — je eine für geringe und eine für hohe Konzentrationen — erstellt, für die sich Korrelationskoeffizienten von $R^2 > 0,99$ ergaben und damit als linear gewertet werden (s. Abb. 4.11).

Die Bestimmungsgrenzen für die einzelnen Verbindungen wurden anhand der Konzentration bei der die Peakfläche noch gut bestimmbar war abgeschätzt. Sie liegen zwischen 0,3 und 1 mg/L.

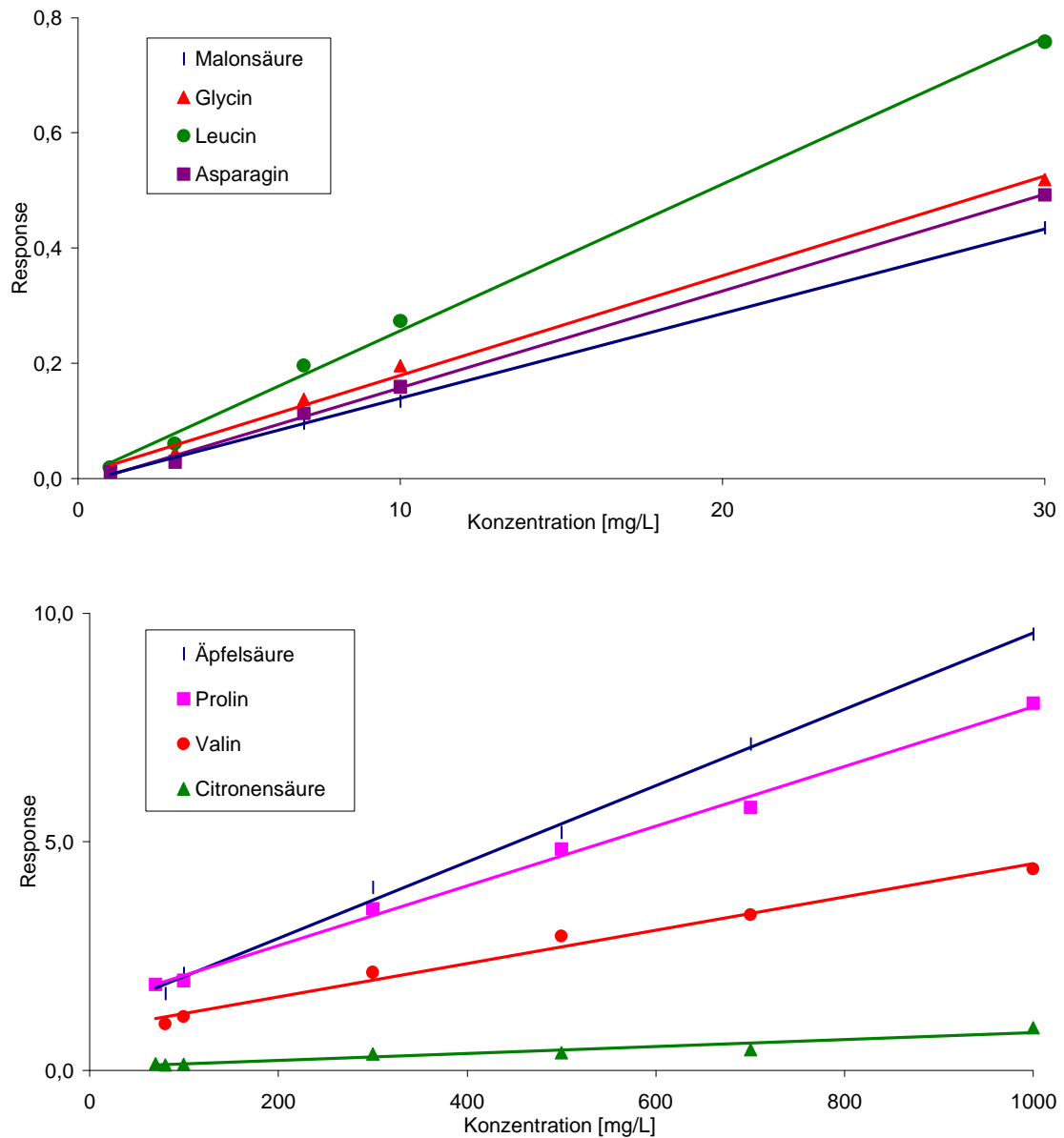


Abb. 4.11: Eichgeraden in zwei Konzentrationsbereichen
oben: 1-30 mg/L von Malonsäure, Glycin, Leucin und Asparagin
unten: 70-1000 mg/L von Äpfel- und Citronensäure, Prolin und Valin

Durch Konzentrierungsschritte während der Aufarbeitung könnten die Bestimmungsgrenzen noch herabgesetzt werden, wodurch aber die Methode aufwendiger würde. Eine Bestimmung von Spuren von Frucht- und Aminosäuren war aber nicht Ziel dieser Arbeit, deshalb wurde eine Optimierung hinsichtlich des Nachweises geringer Konzentrationen nicht weiter verfolgt. Für ein Screening-Verfahren ist eine genaue Quantifizierung der einzelnen Analyten nicht erforderlich, was im Verlauf der vorliegenden Arbeit noch gezeigt wird.

4.2.4 Zusammenfassung

Die eindeutige Identifizierung der Frucht- und Aminosäurederivate ist nach gaschromatographischer Auftrennung mit dem MSD, der substanzspezifische Massenspektren erzeugt, möglich.

Durch die Untersuchung einer Reihe unterschiedlicher Standardverbindungen wurde eine eigene Spektrenbibliothek erstellt. Charakteristische Fragmente in den Massenspektren der Butylderivate wurden interpretiert. Mit Hilfe dieser Fragmente kann auf die Struktur noch nicht in der Bibliothek erfaßter Verbindungen geschlossen werden. Die Spektrenbibliothek erleichtert die eindeutige Identifizierung der Frucht- und Aminosäuren in matrixreichen Proben wie Fruchtsäften.

Obwohl einige für Fruchtsäfte wichtige Verbindungen wie Ascorbinsäure, Chinasäure, Shikimisäure und Arginin nicht detektiert werden konnten, werden die 33 mit BCF derivatisierbaren und anschließender GC-MS nachweisbaren Frucht- und Aminosäuren als ausreichend angesehen, um charakteristische Fingerprints von Fruchtsäften zu erzeugen.

Der MSD ermöglicht auch die Identifizierung und Quantifizierung nicht vollständig getrennter oder durch Matrixpeaks überlagerter Verbindungen. Dabei werden die substanzspezifischen Ionenspuren der Verbindungen im TIC-Chromatogramm genutzt. Somit wird die Multianalyse einer Vielzahl von Verbindungen ermöglicht. Die für die Quantifizierung notwendigen Peakflächen werden mit der dafür erarbeiteten Methode automatisiert ermittelt und die Verbindungen über Eichgeraden quantifiziert. Schwankungen des Systems bzw. der Derivatisierungsausbeute werden durch die Ermittlung des normierten Response über zwei interne Standards ausgeglichen. Die Bestimmungsgrenzen der Analyten liegen mit der Methode ohne Konzentrierung zwischen 0,3 und 1 mg/L.

4.3 Quantitative Untersuchung von Fruchtsäften

In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, daß die vorgestellte in-situ Derivatisierung mit anschließender GC-MS-Analyse der Derivate eine einfache und schnelle Bestimmung verschiedener Frucht- und Aminosäuren in Wasser ermöglicht. Diese Methode soll nun auf matrixreiche Proben wie Fruchtsäfte angewendet werden.

Im Kapitel 2.3 wurden zwei unterschiedliche Verfahren bei der Untersuchung von Fruchtsäften hinsichtlich Authentizität und Qualität vorgestellt. Das erste Verfahren stützt sich dabei auf Grenz- und Richtwerte, die in bestimmten Schwankungsbreiten eingehalten werden müssen. Die dafür notwendigen Werte werden in vielen quantitativen Einzelanalysen gewonnen, deshalb ist das Verfahren recht zeitaufwendig. Hinzu kommen natürliche Schwankungen der einzelnen Parameter, die eine korrekte Beurteilung der vorliegenden Probe erschweren und viel Erfahrung bei der Auswertung der Daten benötigen.

Mit Hilfe der in-situ Derivatisierung mit BCF ist es möglich, mehr als 30 für Fruchtsäfte wichtige Säuren und Aminosäuren zu erfassen und, wie im vorangegangenen Kapitel anhand von Eichgeraden gezeigt werden konnte, in bestimmten Konzentrationsbereichen quantitativ zu bestimmen. Es wurde jedoch auch deutlich, daß der große Konzentrationsunterschied zwischen den einzelnen Analyten Bestimmungen sowohl in konzentrierten als auch in verdünnten Fruchtsaftproben notwendig macht, wenn exakte quantitative Werte erhalten werden sollen. Obwohl die Probenvorbereitung sehr einfach ist, ist der Zeitaufwand für die GC-MS-Analyse mit knapp einer Stunde erheblich. Damit verringert sich der Zeitvorteil der einfachen und schnellen Analyse. Um die sehr konzentrierten Säuren quantitativ bestimmen zu können, wurden die Fruchtsäfte zusätzlich zu den Originalproben in einer Verdünnung von 1:10 analysiert.

Eine sinnvolle und aussichtsreiche Anwendung der hier vorgestellten Methode wird im zweiten in Kapitel 2.3 erwähnten Verfahren - dem Fingerprintverfahren - gesehen. Es stützt sich auf die Auswertung von Mustern, wodurch eine Quantifizierung und Einhaltung genauer Grenzwerte nicht nötig sind. Die Auswertung von Konzentrationsverhältnissen der Analyten zueinander bzw. das Erfassen bestimmter Muster gibt dem Analytiker die Möglichkeit, sich von absoluten Werten zu lösen, die in einem Naturprodukt wie dem Fruchtsaft großen Schwankungen unterlegen sind [BIELIG & HOFSSOMMER 1982; SPRÖER 1985]

In Tabelle 4.3 werden die natürlichen Schwankungen anhand sechs untersuchter Apfelsäfte verschiedener Herkunft demonstriert, in der die ermittelten absoluten Mengen einiger Säuren angegeben sind.

Tabelle 4.3: Konzentration einiger Säuren in sechs untersuchten Apfelsäften

Verbindung	1 (n=5)	2 (n=5)	3 (n=5)	4 (n=5)	5 (n=5)	6 (n=5)	Schwankung
Malonsäure	2,3	1,7	2,2	2,7	2,6	0,9	1-3 mg/L
Bernsteinsäure	3,9	2,4	3,4	7,8	5,9	2,9	2,5-8 mg/L
Valin	9,5	--	11,6	10,0	13,3	--	0-13 mg/L
Threonin	5,8	--	8,8	7,5	9,4	4,7	0-9 mg/L
Prolin	2,0	--	0,8	1,8	2,0	0,6	0-2 mg/L
Asparagin	327	218	319	436	474	270	220-470 mg/L
Asparaginsäure	3,2	1,7	2,6	3,2	3,4	4,5	1,5-4,5 mg/L
Serin	17,3	2,4	21,9	14,2	18,1	5,6	2,5-22 mg/L
Glutaminsäure	11,3	4,7	11,4	9,1	12,2	7,1	4,5-12 mg/L

Noch deutlicher kommen die Schwankungen in der graphischen Darstellung der Absolutwerte am Beispiel des Asparagin zum Ausdruck (s. Abb. 4.12).

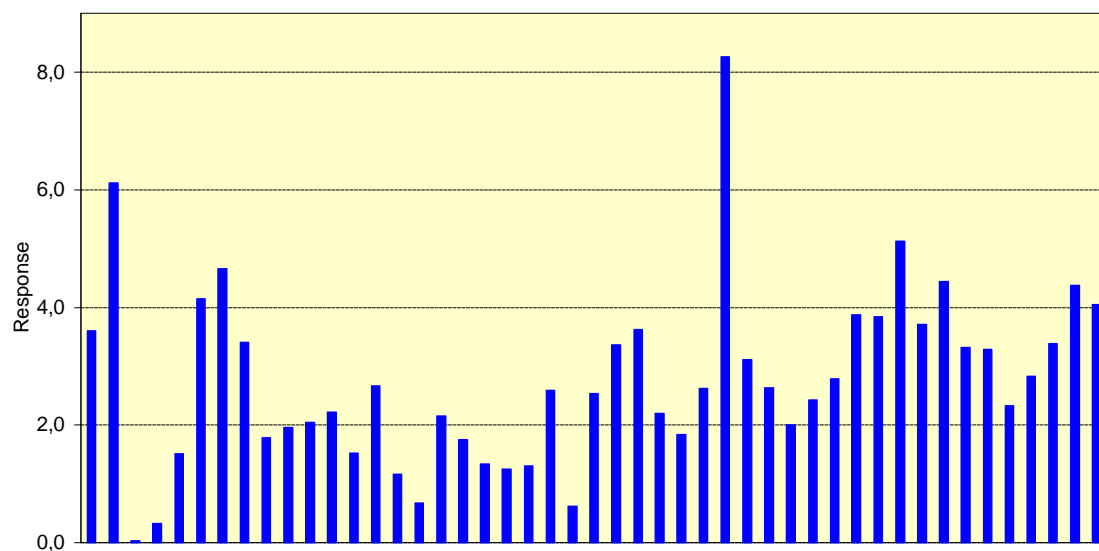


Abb. 4.12: Schwankungen des Asparaginresponse in 47 untersuchten Apfelsäften

Im Diagramm ist der Response³ von Asparagin in 47 untersuchten Apfelsäften dargestellt. Die Werte schwanken dabei zwischen etwas über 8 und weniger als 0,5.

Nicht alle untersuchten Säuren schwanken so stark, aber das Beispiel verdeutlicht wie schwierig es ist, für ein Naturprodukt wie den Apfelsaft Richt- und Grenzwerte für eine Beurteilung festzulegen.

Die quantitativen Untersuchungen wurden in dieser Arbeit, die das Ziel verfolgt eine einfache und schnelle Screeninganalyse zu entwickeln, nicht weiter ausgearbeitet. Auch hätten die aufwendig ermittelten Werte der einzelnen Säuren hinsichtlich des Ziels, mögliche Verfälschungen eines Fruchtsaftes zu erkennen, wenig Aussagekraft.

Die Quantifizierung einzelner Analyten könnte das Ziel zukünftiger Arbeiten auf dem Gebiet der Analytik polarer Inhaltsstoffe des Fruchtsaftes sein.

³ Der Response wird aus der Peakfläche des Derivates im TIC-Chromatogramm geteilt durch die Peakfläche des ISTD ermittelt und stellt einen normierten Wert ohne Einheit dar.

4.4 Qualitative Untersuchungen verschiedener Fruchtarten zur Aufnahme von Fingerprints

Mit dem Ziel eine Anwendung der vorgestellten Methode als Screeninganalyse mittels Fingerprints zu entwickeln, wurden zunächst 15 verschiedene Fruchtarten qualitativ untersucht (Zusammenstellung der Proben in Anhang G). Mit Hilfe der dabei erhaltenen Chromatogramme sollte ermittelt werden, ob die Relationen der Säuren zueinander fruchttypisch sind und eine Unterscheidung der einzelnen Fruchtarten auf diese Weise möglich ist. Da die qualitative Auswertung der Chromatogramme durch Beschreibung und Vergleich der Peakflächen erfolgt und die einzelnen Säuren unterschiedlich derivatisiert und detektiert werden (s. Kapitel 4.2.1), soll für die weiteren Betrachtungen in dieser Arbeit folgendes festgelegt werden:

- Anstatt *Derivat der Säure XY* zu sagen, wird von der *Säure XY* gesprochen. Gemeint ist grundsätzlich das Derivat, da die Säure selbst im Chromatogramm nicht wiedergegeben wird.
- Wenn eine Säure als *wichtig* oder *dominierend* bezeichnet wird, bezieht sich die Aussage nur auf die mit dieser Methode ermittelte Peakfläche im Chromatogramm bzw. Fingerprint. Es sind qualitative Aussagen bei der bildlichen Auswertung und nicht gleichzusetzen mit Aussagen über Konzentrationen. Ein Vergleich mit anderen Methoden oder Literaturangaben ist daher nur bedingt möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Beerenobstarten, Kern- und Steinobstarten sowie Citrusfrüchte untersucht.

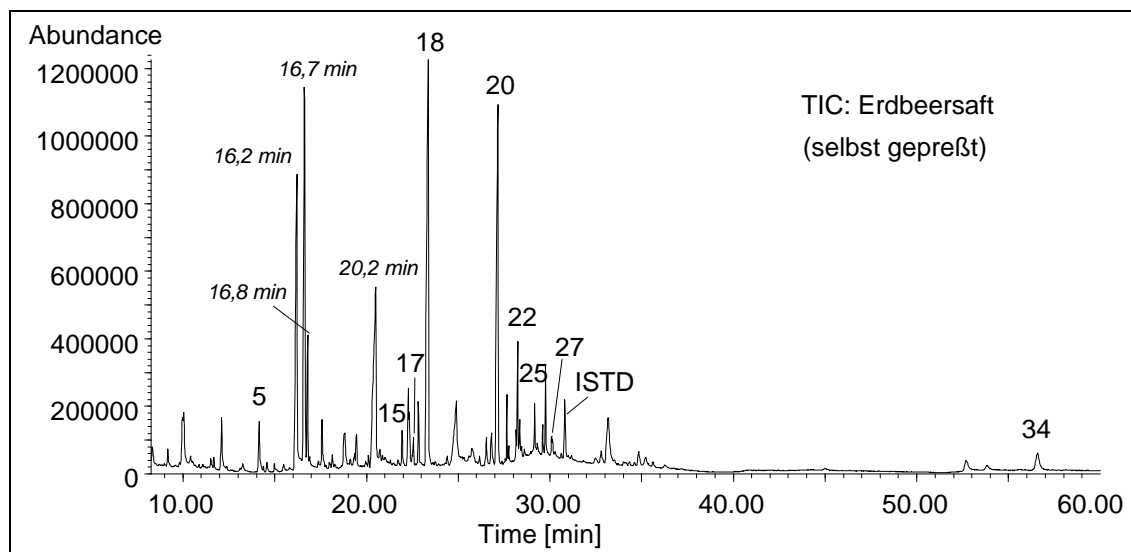
4.4.1 Beerenobst

Zum Beerenobst gehören sowohl die echten Beeren wie Johannisbeeren, Heidelbeeren oder Weintrauben, als auch Sammelfrüchte wie Erdbeeren, Himbeeren oder Brombeeren. In der vorliegenden Arbeit wurden Erdbeer-, Brombeer-, Himbeer-, Johannisbeer- und Traubensaft untersucht. Dazu wurden die Früchte in einem Becherglas zerdrückt und der entstandene Saft durch Filtration abgetrennt. Je 300 µl des Saftes wurden ohne weitere Aufarbeitungsschritte direkt mit BCF derivatisiert und anschließend mittels GC-MS analysiert (Derivatisierungsvorschrift siehe Anhang C).

Im Beerenobst ist die *Citronensäure* neben der *Äpfelsäure* als Hauptsäure beschrieben worden. Ausnahmen bilden Brombeeren mit *Isocitronensäure* und Trauben mit *Weinsäure* als vorherrschende Säuren [SCHOBINGER 1987].

Die Fingerprints von Erdbeer- und Traubensaft sollen beispielhaft für diese Fruchtgruppe dargestellt und die charakteristischen Merkmale herausgearbeitet werden.

Im Fingerprint = Chromatogramm des Erdbeersaftes (Abb. 4.13) dominieren vier Peaks. Zwei nicht zu den untersuchten Frucht- und Aminosäuren gehörende Matrixpeaks mit Retentionszeiten (Rt) zwischen 16 und 17 min, der Asparaginpeak (18) und der Peak der Äpfelsäure (20). Die Citronensäure (22) wird ebenfalls mit einem recht großen Signal detektiert, tritt im Fingerprint aber nicht als Hauptsäure in Erscheinung.



5 = Fumarsäure, 15 = Threonin, 17 = Prolin, 18 = Asparagin, 20 = Äpfelsäure, 22 = Citronensäure, 25 = Phenylalanin, 27 = Glutaminsäure, 34 = Tryptophan

Abb. 4.13: TIC-Chromatogramm eines derivatisierten Erdbeersaftes, selbst gepreßt (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

Die Peakgruppe mit Rt zwischen 16 und 17 min ist allen untersuchten Beerensäften außer Traubensaft gemeinsam (Siehe Abb. 4.14 und Anhang F). Die Peaks unterscheiden sich nur in der Größe und den Verhältnissen zueinander und sind dadurch hilfreich bei der Zuordnung des Fingerprints zu der entsprechenden Beerenart.

Im Erdbeersaft konnten insgesamt die in Tabelle 4.4 aufgeführten Frucht- und Aminosäuren nachgewiesen werden.

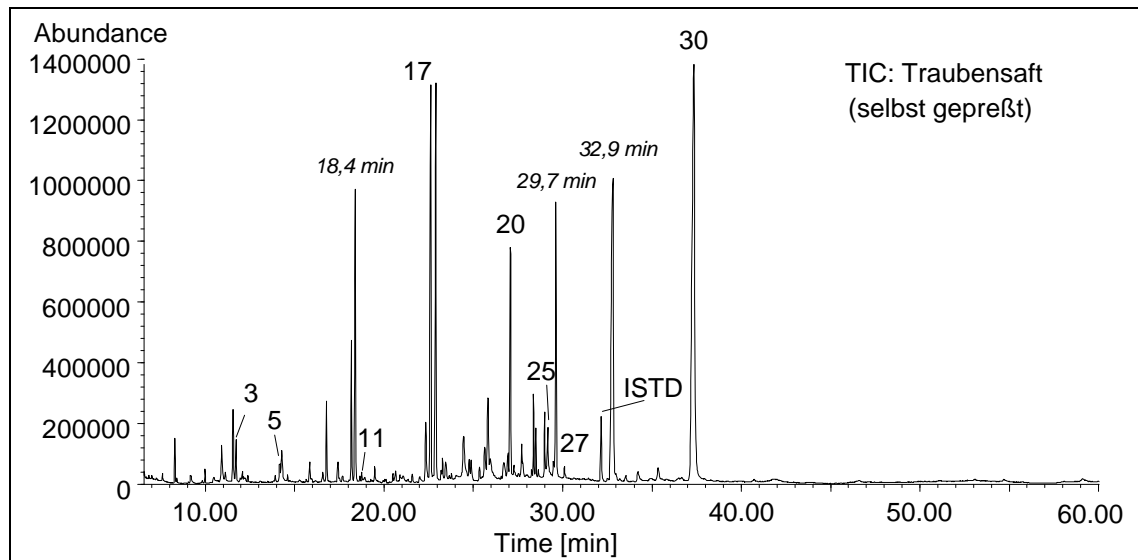
Tabelle 4.4: Frucht- und Aminosäuren in Erdbeersaft

Verbindung	qualitativer Nachweis	Verbindung	qualitativer Nachweis
Malonsäure	++	Benzoessäure	--
Bernsteinsäure	++	Salicylsäure	--
Fumarsäure	+++	Glycin	+
Maleinsäure	++	Valin	+
Sorbinsäure	--	Alanin	++
Glycolsäure	--	Leucin	++
Milchsäure	--	Isoleucin	--
Äpfelsäure	Hauptsäure	Threonin	+++
Isocitronensäure	+++	γ -Aminobuttersäure	++
Citronensäure	+++	Prolin	+++
Weinsäure	--	Serin	+++
Asparagin	stärkste Aminosäure	Glutaminsäure	+++
Methionin	--	Lysin	--
Asparaginsäure	+++	Histidin	--
Phenylalanin	+++	Tryptophan	+++
Stearinsäure	++	Tyrosin	--
--	nicht nachgewiesen		
+	über Ionenspur nachweisbare Säuren		
++	kleiner Peak, aber gut über Spektrum nachweisbar		
+++	Peak gut bis sehr gut zu erkennen, sehr gut nachweisbar		

Daß Brombeer- und Traubensaft sich durch eine andere Säureverteilung, wie in der Literatur beschrieben, stark von den anderen Beerensäften unterscheiden, konnte bestätigt werden. Die Fingerprints fallen durch die großen Signale der Isocitronensäure bzw. der Weinsäure auf und können mit denen der anderen Beerensäfte nicht verwechselt werden.

Im Fingerprint des Traubensaftes (Abb. 4.14) dominiert die Weinsäure (30), die in keinem anderen untersuchten Saft nachgewiesen werden konnte.

Der Prolinpeak (17) und weitere nicht näher identifizierte Matrixpeaks ($R_t = 18,4$ min, 29,7 min, 32,9 min) haben ebenfalls hohe Intensitäten und bestimmen neben der Weinsäure den Fingerprint. Der Asparaginpeak fehlt hingegen ganz und der Äpfelsäurepeak (20) ist vergleichsweise klein.



3 = Malonsäure, 5 = Fumarsäure, 11 = Valin, 17 = Prolin, 20 = Äpfelsäure, 25 = Phenylalanin, 27 = Glutaminsäure, 30 = Weinsäure

Abb. 4.14: TIC-Chromatogramm eines derivatisierten Traubensaftes, selbst gepreßt (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

Tabelle 4.5: Frucht- und Aminosäuren in Traubensaft

Verbindung	qualitativer Nachweis	Verbindung	qualitativer Nachweis
Malonsäure	++	Benzoessäure	--
Bernsteinsäure	+	Salicylsäure	--
Fumarsäure	++	Glycin	--
Maleinsäure	++	Valin	++
Sorbinsäure	--	Alanin	--
Glycolsäure	--	Leucin	++
Milchsäure	++	Isoleucin	--
Äpfelsäure	+++	Threonin	++
Isocitronensäure	--	γ-Aminobuttersäure	--
Citronensäure	--	Prolin	stärkste Aminosäure
Weinsäure	Hauptsäure	Serin	--
Asparagin	--	Glutaminsäure	+++
Methionin	--	Lysin	--
Asparaginsäure	--	Histidin	--
Phenylalanin	+++	Tryptophan	--
Stearinsäure	++	Tyrosin	--

-- nicht nachgewiesen; + über Ionenspur nachweisbare Säuren; ++ kleiner Peak, gut über Spektrum nachweisbar; +++ Peak gut bis sehr gut zu erkennen, sehr gut nachweisbar

Im Traubensaft konnten 15 der untersuchten Frucht- und Aminosäuren nachgewiesen werden (s. Tabelle 4.5), ein Großteil jedoch nur über ihre Ionenspuren.

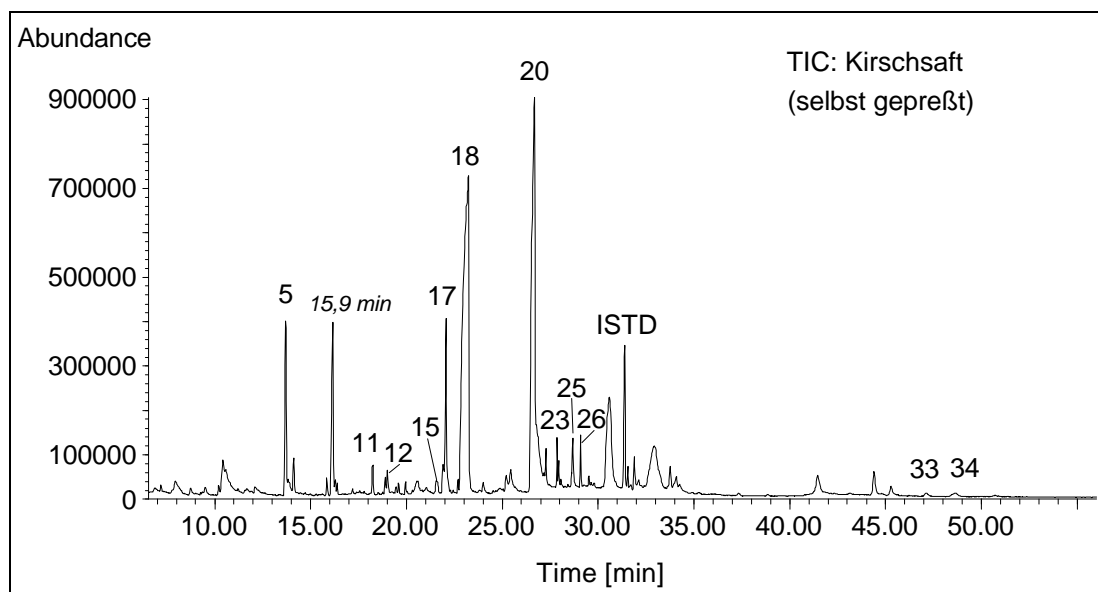
Die Säfte der Beerenobstarten können sehr gut visuell voneinander unterschieden werden. Typische Verhältnisse der Signalflächen der Frucht- und Aminosäuren im Fingerprint, das Fehlen einzelner bzw. der Nachweis dominierender Säuren macht eine Zuordnung der Fingerprints zu der jeweiligen Beerenart möglich.

Bei der qualitativen Auswertung wird deutlich, daß auch Peaks nicht näher identifizierter Verbindungen bei der Charakterisierung und Zuordnung der Fingerprints von Bedeutung sind. Sie sind ebenso charakteristisch für die einzelne Frucht, wie die untersuchten Analyten selbst. Aus ihren Spektren geht hervor, daß sie ebenfalls mit BCF derivatisiert sind, also erst durch die Derivatisierung auftreten.

4.4.2 Kern- und Steinobst

Zum Kern- und Steinobst gehören neben dem Apfel u.a. Birne, Pfirsich und Kirsche. Die Hauptsäure dieser Obstarten ist mit 50-90 % der Gesamtsäure die Äpfelsäure [SCHOBINGER 1987]. Durch die untersuchten Proben konnte dies bestätigt werden. Hier sollen als Beispiele die Fingerprints von Kirsch- und Pfirsichsaft zur Erläuterung dienen. Die Fingerprints von Apfel- und Birnensaft werden in Kapitel 4.5.1 und 4.5.6.3 noch ausführlich diskutiert und verglichen.

Der für die Derivatisierung notwendige Saft wurde - wie schon beim Beerenobst - direkt aus den Früchten durch Zerkleinern und Filtrieren gewonnen.



5 = Fumarsäure, 11 = Valin, 12 = Alanin, 15 = Threonin, 17 = Prolin, 18 = Asparagin, 20 = Äpfelsäure, 23 = Asparaginsäure, 25 = Phenylalanin, 26 = Serin, 33 = Tyrosin, 34 = Tryptophan

Abb. 4.15: TIC-Chromatogramm eines derivatisierten Kirschsaftes, selbst gepreßt (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

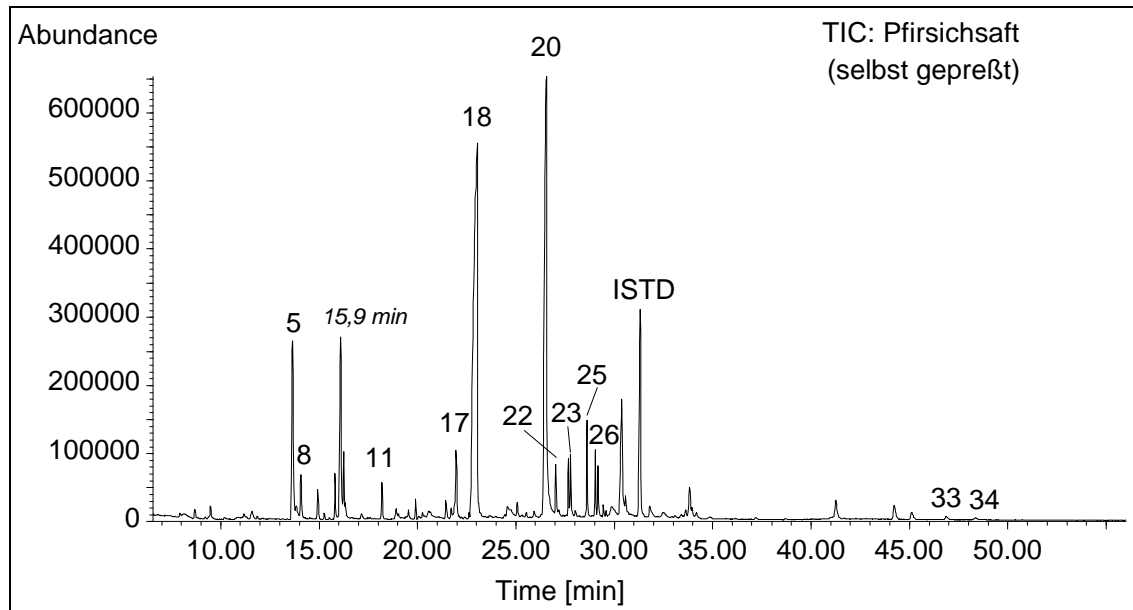
Im Fingerprint des Kirschsaftes (Abb. 4.15) dominieren die Peaks der Äpfelsäure (20) und des Asparagins (18). Nahezu gleich groß sind die Peaks der Fumarsäure (5) und des Prolins (17) und ein Matrixpeak bei $R_t = 15,9$ min, der in allen Kern- und Steinobstfrüchten nachgewiesen wurde. Die anderen Frucht- und Aminosäuren weisen kleine Peaks auf (11, 12, 15, 33, 34) oder können nur über ihre Ionenspuren nachgewiesen werden. Die Signalfächen der Aminosäuren Asparaginsäure (23), Phenylalanin (25) und Serin (26) sind in dem dargestellten Kirschsaft von nahezu gleicher Intensität. Lediglich 19 der 33 untersuchten Säuren konnten im Kirschsaft identifiziert werden (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Nachweis der Frucht- und Aminosäuren im Kirschsafft

Verbindung	qualitativer Nachweis	Verbindung	qualitativer Nachweis
Malonsäure	++	Benzoessäure	--
Bernsteinsäure	--	Salicylsäure	--
Fumarsäure	+++	Glycin	++
Maleinsäure	+++	Valin	+++
Sorbinsäure	--	Alanin	--
Glycolsäure	--	Leucin	++
Milchsäure	--	Isoleucin	+
Äpfelsäure	Hauptsäure	Threonin	++
Isocitronensäure	+	γ -Aminobuttersäure	+++
Citronensäure	+	Prolin	+++
Weinsäure	--	Serin	++
Asparagin	stärkste Aminosäure	Glutaminsäure	++
Methionin	--	Lysin	--
Stearinsäure	+	Tyrosin	++
Asparaginsäure	+++	Histidin	--
Phenylalanin	++	Tryptophan	+++

-- nicht nachgewiesen; + über Ionenspur nachweisbare Säuren; ++ kleiner Peak, gut über Spektrum nachweisbar; +++ Peak gut bis sehr gut zu erkennen, sehr gut nachweisbar

Im Pfirsichsaft (Abb. 4.16) sind die Peaks der Äpfelsäure (20) und des Asparagins (18) wieder dominierend. Im Vergleich zum Kirschsafft fällt jedoch ein anderes Verhältnis der Signalflächen von Prolin (17) zu Asparagin auf. Prolin wird im Pfirsichsaft mit einer viel geringeren Intensität detektiert als im Kirschsafft. Ein weiterer Unterschied ist der Nachweis der Citronensäure (22) im Pfirsichsaft, die im Kirschsafft fehlt. Im Kirschsafft hingegen können stattdessen Alanin (12), Threonin (15) und verschiedene Matrixpeaks nachgewiesen werden, die im untersuchten Pfirsichsaft nicht detektierbar sind. Die Verhältnisse der Signalflächen von Fumarsäure (5) zum Matrixpeak bei $R_t = 15,9$ min, zu Asparagin (18) und zur Äpfelsäure (20) entsprechen denen im Kirschsafft.



5 = Fumarsäure, 8 = Maleinsäure, 11 = Valin, 17 = Prolin, 18 = Asparagin, 20 = Äpfelsäure, 22 = Citronensäure, 23 = Asparaginsäure, 25 = Phenylalanin, 26 = Serin, 33 = Tyrosin, 34 = Tryptophan

Abb. 4.16: TIC-Chromatogramm eines derivatisierten Pfirsichsaftes, selbst gepreßt (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

Insgesamt konnten im Pfirsichsaft 21 Frucht- und Aminosäuren nachgewiesen werden.

Tabelle 4.7: Nachweis der Frucht- und Aminosäuren im Pfirsichsaft

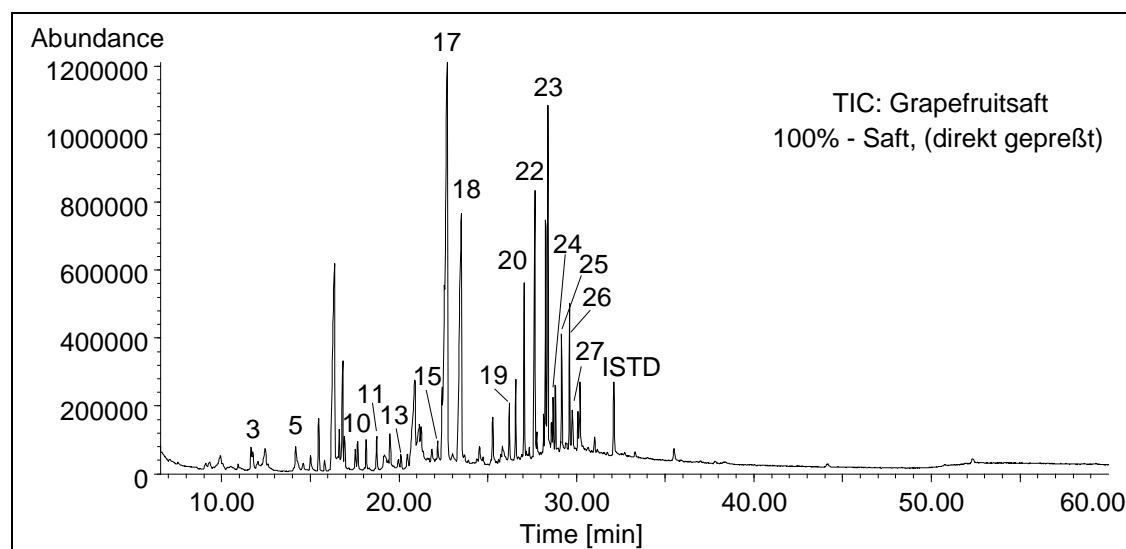
Verbindung	qualitativer Nachweis	Verbindung	qualitativer Nachweis
Malonsäure	++	Benzoessäure	--
Bernsteinsäure	++	Tyrosin	++
Fumarsäure	+++	Glycin	++
Maleinsäure	+++	Valin	+++
Sorbinsäure	--	Alanin	++
Glycolsäure	--	Leucin	++
Milchsäure	--	Isoleucin	++
Äpfelsäure	Hauptsäure	Threonin	+++
Isocitronensäure	++	γ -Aminobuttersäure	--
Citronensäure	+++	Prolin	+++
Weinsäure	--	Serin	+++
Asparagin	stärkste Aminosäure	Glutaminsäure	++
Methionin	--	Lysin	--
Asparaginsäure	+++	Histidin	--
Phenylalanin	+++	Tryptophan	++

-- nicht nachgewiesen; + über Ionenspur nachweisbare Säuren; ++ kleiner Peak, gut über Spektrum nachweisbar; +++ Peak gut bis sehr gut zu erkennen, sehr gut nachweisbar

Für die Fingerprints der Kern- und Steinobstarten sind die großen Peaks von Äpfelsäure (20), Fumarsäure (5) und Asparagin (18) charakteristisch. Ebenso der Matrixpeak bei $R_t = 15,9$ min. Jedoch sind die Verhältnisse der Peakflächen zueinander so unterschiedlich, daß sich die einzelnen Arten deutlich voneinander unterscheiden. Für die beiden vorgestellten Säfte konnten sowohl Gemeinsamkeiten als auch prägnante Unterscheidungsmerkmale festgestellt werden, die eine Identifizierung der Fruchtarten zulassen. Dies gilt ebenso für die anderen Kern- und Steinobstsäfte (Siehe Anhang F). In Pfirsich- und Birnensaft wurden gegenüber den anderen Kern- und Steinobstsäften deutlich höhere Konzentrationen Citronensäure nachgewiesen. Äpfelsäure stellt aber ohne Ausnahme die Hauptsäure in den untersuchten Kern- und Steinobstsäften dar.

4.4.3 Citrusfrüchte

Die Citrusfrüchte zeichnen sich durch hohe Citronensäurekonzentrationen aus und ihre Fingerprints sind dadurch eindeutig von denen anderer untersuchter Früchte zu unterscheiden. Es wurden Orangen-, Grapefruit-, Mandarinen-, Zitronen- und Limonensaft untersucht. Am Fingerprint des Grapefruitsaftes sollen die typischen Merkmale und die Unterschiede zu den bisher untersuchten Säften erläutert werden (Abb. 4.17). Für die Derivatisierung von Grapefruitsaft wurde ein kommerziell erhältlicher Saft eingesetzt.



3 = Malonsäure, 5 = Fumarsäure, 10 = Glycin, 11 = Valin, 13 = Leucin, 15 = Threonin, 17 = Prolin, 18 = Asparagin, 19 = Isocitronensäure, 20 = Äpfelsäure, 22 = Citronensäure, 23 = Asparaginsäure, 24 = Stearinsäure, 25 = Phenylalanin, 26 = Serin, 27 = Glutaminsäure

Abb. 4.17: TIC-Chromatogramm des derivatisierten Grapefruitsaftes (Fa. Reichelt Berlin, 100 %-Saft, direkt gepreßt, GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

Im Fingerprint des Grapefruitsaftes (Abb. 4.17) ist der Prolinpeak (17) neben dem von Asparagin (18) und dem Citronensäurepeak (22) dominierend. Im Unterschied zu den anderen untersuchten Fruchtsäften tritt der Peak der Äpfelsäure (20) gegenüber dem Peak der Citronensäure deutlich zurück. In Zitronensaft konnte Äpfelsäure überhaupt nicht nachgewiesen werden (Siehe Anhang F).

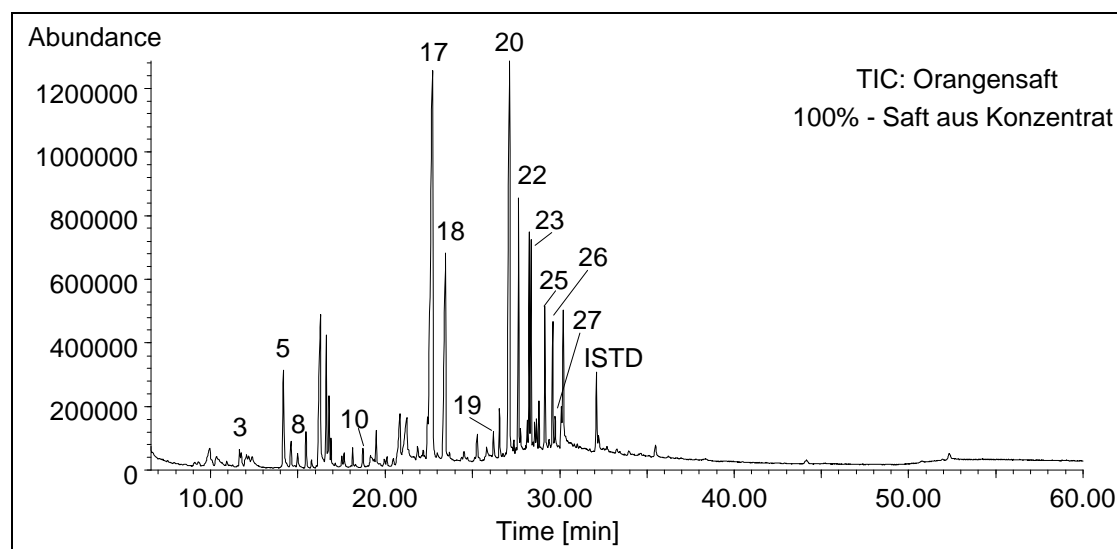
Das Fruchtsäure-Aminosäure-Muster des Grapefruitsaftes wird einerseits durch die vier größten Peaks (17, 23, 22, 18) geprägt und andererseits von den intensiven Peaks der Aminosäuren Serin (25), Phenylalanin (26) und dem der Stearinsäure (24). Dadurch wirkt der Fingerprint im mittleren Retentionsbereich (zwischen 22 und 30 min) sehr dicht. Fumarsäure (5) wurde mit viel geringerer Intensität als z. B. in den untersuchten Kern- und Steinobstsäften nachgewiesen. Dafür haben Glycin (10), Valin (11) und Leucin (13) höhere Signale. Das Verhältnis der Signalflächen von Prolin (17) zu Asparagin (18) ist im Grapefruitsaft genau umgekehrt. Prolin weist eine deutlich höhere Intensität gegenüber Asparagin auf, was in den anderen Säften außer Traubensaft bisher nicht der Fall war. Insgesamt wurden im Grapefruitsaft 20 Frucht- und Aminosäuren identifiziert (Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8: Nachweis der Frucht- und Aminosäuren im Grapefruitsaft

Verbindung	qualitativer Nachweis	Verbindung	qualitativer Nachweis
Malonsäure	+++	Benzoessäure	--
Bernsteinsäure	--	Salicylsäure	--
Fumarsäure	+++	Glycin	++
Maleinsäure	++	Valin	++
Sorbinsäure	--	Alanin	--
Glycolsäure	--	Leucin	++
Milchsäure	+	Isoleucin	+
Äpfelsäure	+++	Threonin	++
Isocitronensäure	+++	γ -Aminobuttersäure	++
Citronensäure	Hauptsäure	Prolin	stärkste Aminosäure
Weinsäure	--	Serin	+++
Asparagin	+++	Glutaminsäure	+++
Methionin	--	Lysin	--
Asparaginsäure	+++	Histidin	--
Phenylalanin	+++	Tryptophan	--

-- nicht nachgewiesen; + über Ionenspur nachweisbare Säuren; ++ kleiner Peak, gut über Spektrum nachweisbar; +++ Peak gut bis sehr gut zu erkennen, sehr gut nachweisbar

Durch die für Citrusfrüchte typischen relativ großen Peaks der Aminosäuren Asparaginsäure (23), Phenylalanin (25) und Serin (26) konzentrieren sich die wichtigen Peaks zwischen $R_t = 22$ min und 30 min, wodurch der Fingerprint dieser Früchte in diesem Bereich gegenüber den bisher vorgestellten Säften viel dichter erscheint (s. auch Abb. 4.18 und Anhang F).



3 = Malonsäure, 5 = Fumarsäure, 8 = Maleinsäure, 10 = Glycin, 17 = Prolin, 18 = Asparagin, 19 = Isocitronensäure, 20 = Äpfelsäure, 22 = Citronensäure, 23 = Asparaginsäure, 25 = Phenylalanin, 26 = Serin, 27 = Glutaminsäure

Abb. 4.18: *TIC-Chromatogramm des derivatisierten Orangensaftes (Fa. Reichelt Berlin, 100 %-Saft, aus Konzentrat, GC-MS-Bedingungen in Anhang B)*

Aufgrund dieser Peakdichte sind die Citrusfrüchte rasch zu erkennen und von den anderen untersuchten Obstarten abgrenzbar. Über die Verhältnisse der Aminosäuren zueinander und zu den Fruchtsäuren Citronen- (22), Äpfel- (20) und Isocitronensäure (19) lassen sich die einzelnen Citrusfrüchte differenzieren.

4.4.4 Ergebnisse und Diskussion

Anhand der dargestellten Beispiele der insgesamt 15 untersuchten Fruchtarten konnte gezeigt werden, daß die Chromatogramme der einzelnen Fruchtarten typische Muster widerspiegeln, mit deren Hilfe eine Unterscheidung der Früchte möglich ist. Sogar die Zuordnung zu den einzelnen botanischen Gruppen Beerenobst, Kern- und Steinobst sowie Citrusfrüchte ist durch die Frucht- und Aminosäure- Fingerprints möglich. Das erlaubt eine Abgrenzung zwischen den Gruppen und ein erstes grobes Ausschlußverfahren. Schon allein durch den visuellen Vergleich der Chromatogramme konnten charakteristische Merkmale für die verschiedenen Früchte erarbeitet und die Fruchtarten unterschieden werden.

Die qualitative Analyse der verschiedenen Fruchtsäfte und der Vergleich der erhaltenen Fingerprints war ein notwendiger und erfolgreicher Schritt für die Entwicklung der Screeninganalyse. Durch diese Untersuchungen wurde gezeigt, daß die neue in-situ Derivatisierung bei der Untersuchung matrixreicher Fruchtsaftproben schnell und ohne aufwendige Verfahren Fruchtsäure-Aminosäure-Fingerprints liefert, die eine Aussage über die Fruchtart zulassen. Eine weitere detaillierte Auswertung der Fingerprints über die bildliche Beschreibung hinaus soll im Folgenden durchgeführt werden.

Die Ergebnisse dieser qualitativen Untersuchungen bestätigen die Vermutung, daß ein Screening mit Hilfe der Fruchtsäure-Aminosäure-Fingerprints hinsichtlich der Authentizität eines Fruchtsaftes möglich ist und aufwendigere Verfahren ersetzen könnte.

Das Potential des visuellen Vergleiches und der anschließenden Mustererkennung durch den Menschen ist im Vorangegangenen sehr deutlich geworden. Typische Muster, auch wenn sie durch Schwankungen etwas verzerrt werden, werden vom Analytiker wiedererkannt und lassen sich zuordnen. Vergleichbar damit ist die eindeutige Identifizierung von bekannten Gesichtern auch bei verschwommener Darstellung durch das menschliche Auge. Viele Versuche und Forschungen auf dem Gebiet der rechnergestützten Mustererkennung durch selbstlernende Programme belegen, wie schwierig dieser für den Menschen einfache Vorgang zu simulieren ist [FEYRER & ZELL 1999; D`AVIS 1997].

Anhand der visuellen Auswertung der Fingerprints verschiedener Fruchtarten konnte gezeigt werden, daß diese Entwicklung auch für die chemische Analytik interessant sein kann.

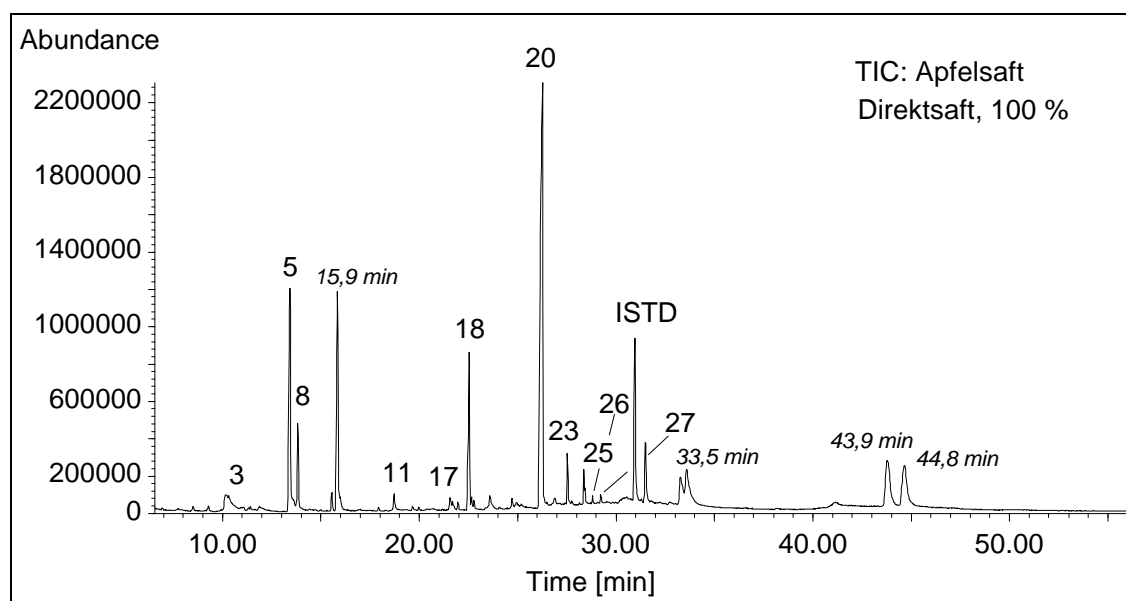
In dieser Arbeit soll im Folgenden am Beispiel des Apfelsaftes der Versuch gemacht werden, mit vergleichsweise einfachen Mitteln Fingerprints rechnergestützt auszuwerten, um Säfte bzw. deren Verfälschungen zu erkennen.

4.5 Entwicklung eines Screeningverfahrens für Apfelsäfte über Fingerprinterkennung

4.5.1 Fingerprint von Apfelsaft - Kennzeichen

Insgesamt wurden 47 verschiedene Apfelsäfte untersucht, die Sorten und deren Herkunft sind im Anhang G zusammengestellt. Die für die Derivatisierung eingesetzten Säfte wurden zum Teil im Labor aus den Früchten erzeugt oder im Handel erworben und unverdünnt ohne weitere Probenvorbereitung eingesetzt. Die Gewinnung des Saftes aus den Früchten erfolgte nach Zerkleinerung im Mixer und anschließender Filtration des Fruchtsaftes. Bei den Handelsproben wurden sowohl klare als auch naturtrübe, direkt gepreßte ebenso wie Säfte aus Konzentrat gewählt.

In der Abb. 4.19 ist der typische Fingerprint eines Apfelsaftes dargestellt.



3 = Malonsäure, 5 = Fumarsäure, 8 = Maleinsäure, 11 = Valin, 17 = Prolin, 18 = Asparagin, 20 = Äpfelsäure, 23 = Asparaginsäure, 25 = Phenylalanin, 26 = Serin, 27 = Glutaminsäure

Abb. 4.19: TIC eines Apfelsaftes (Fa. Klindworth, Direktsaft 100 %, GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

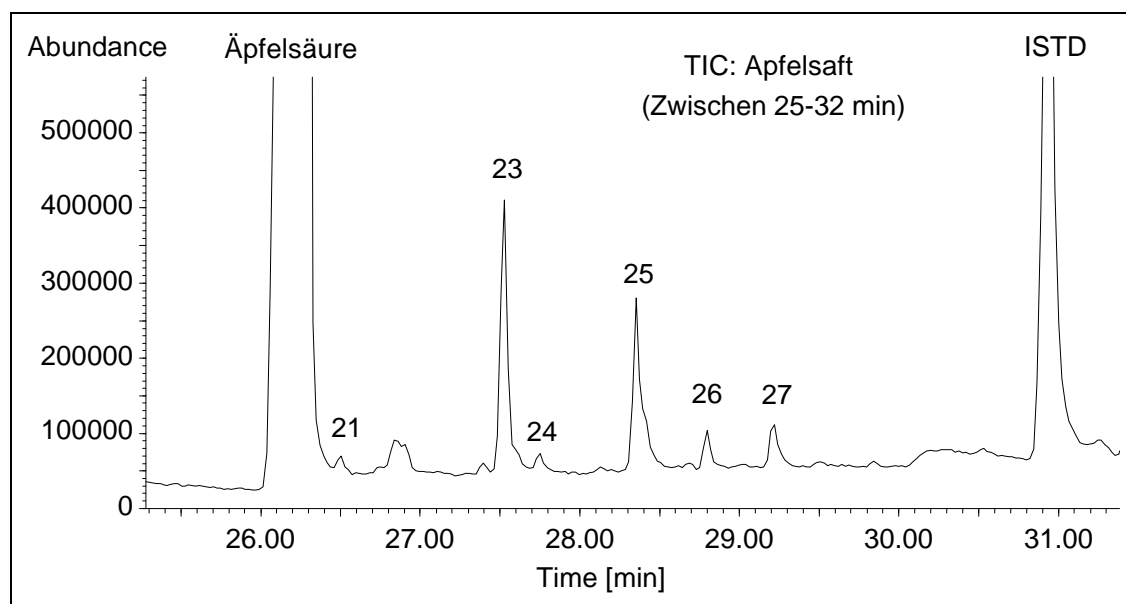
Der Fingerprint von Apfelsaft zeichnet sich gegenüber anderen untersuchten Säften (Vgl. Anhang F) durch eine relativ kleine Zahl von Peaks aus und wirkt dadurch sehr übersichtlich. Aufgrund der typischen Peaks kann der Fingerprint dem Kern- und Steinobst zugeordnet werden. Auffallend und charakteristisch sind die Peaks von Äpfelsäure (20), Asparagin (18), Fumarsäure (5), Maleinsäure und der Peak bei $R_t = 15,9$ min. Dieser Matrixpeak ist in allen Kern- und Steinobstfrüchten nach-

gewiesen worden und entsteht wahrscheinlich bei sehr hoher Äpfelsäurekonzentration durch unvollständige Derivatisierung der Säure. Das Spektrum der Verbindung läßt auf das Derivat der Äpfelsäure mit noch freier OH-Gruppe schließen.

Weiterhin sind die nicht näher charakterisierten Doppelpeaks im hinteren Bereich des Chromatogramms bei $R_t = 33$ und 44 min. für eine Identifizierung wichtig.

Verglichen mit den anderen Kern- und Steinobstsäften zeichnet sich Apfelsaft durch einen sehr kleinen Prolinpeak (17), ein geringes oder kein Citronensäuresignal und kleine Peaks von Valin (11), Serin (26) und Glutaminsäure (27) aus. Im Apfelsaft werden zudem kaum nicht weiter identifizierte Matrixpeaks detektiert, so daß die Grundlinie wenig Rauschen aufweist. All diese Merkmale erlauben eine eindeutige Identifizierung und Abgrenzung von Apfel gegenüber den anderen untersuchten Kern- und Steinobstsäften.

Der Bereich des Fingerprints zwischen Äpfelsäure ($R_t = 26,2$ min) und ISTD ($R_t = 31$ min) ist ebenfalls für Apfelsaft charakteristisch und in Abb. 4.20 vergrößert dargestellt. Neben Äpfelsäure ist meist nur ein kleiner Peak von Methionin (21) zu erkennen, der Citronensäurepeak fehlt oder ist nur sehr klein, es folgt der größere Peak der Asparaginsäure (23), ein etwas kleinerer Phenylalaninpeak (25) und ungefähr von gleicher Größe die kleineren Peaks von Serin (26) und Glutaminsäure (27). Ansonsten ist die Grundlinie unverrauscht und nicht durch Matrixpeaks wie bei einigen anderen Säften gestört. Dadurch tritt die Peakgruppe der vier Aminosäuren (23, 25, 26, 27) so deutlich hervor und stellt ein einprägsames Merkmal für Apfelsaft dar.



21 = Methionin, 23 = Asparaginsäure, 24 = Stearinsäure, 25 = Phenylalanin, 26 = Serin, 27 = Glutaminsäure

Abb. 4.20: Vergrößerte Darstellung des TIC von Apfelsaft zwischen 25 min und 32 min (Ausschnitt aus Abb. 4.19)

Tabelle 4.9: Frucht- und Aminosäuren in Apfelsaft

Verbindung	qualitativer Nachweis	Verbindung	qualitativer Nachweis
Malonsäure	++	Benzoessäure	--
Bernsteinsäure	+	Salicylsäure	--
Fumarsäure	+++	Glycin	+
Maleinsäure	+++	Valin	++
Sorbinsäure	--	Alanin	+
Glycolsäure	+	Leucin	+
Milchsäure	+	Isoleucin	+
Äpfelsäure	Hauptsäure	Threonin	++
Isocitronensäure	+	γ -Aminobuttersäure	+
Citronensäure	+	Prolin	+++
Weinsäure	--	Serin	+++
Asparagin	stärkste Aminosäure	Glutaminsäure	+++
Methionin	+	Lysin	--
Asparaginsäure	+++	Histidin	--
Glutamin	--	Oxalsäure	--
Glutarsäure	--	Tyrosin	--
Phenylalanin	+++	Tryptophan	--

-- nicht nachgewiesen; + über Ionenspur nachweisbare Säuren; ++ kleiner Peak, gut über Spektrum nachweisbar; +++ Peak gut bis sehr gut zu erkennen, sehr gut nachweisbar

Mit Hilfe der Spektren und Ionenspuren der Verbindungen konnten im Apfelsaft insgesamt 23 der insgesamt 33 untersuchten Frucht- und Aminosäuren nachgewiesen werden.

4.5.2 Erweiterung der Methode und Absicherung der Ergebnisse

4.5.2.1 Ermittlung der Peakflächen

Für die Auswertung der Fingerprints wurde eine Methode erarbeitet, bei der vom Programm die TIC-Chromatogramme des MS auf die gesuchten Verbindungen abgescannt und die Peakflächen der jeweiligen Verbindung berechnet werden. Tabellarisch oder als Datenfile werden die Daten für 35 Frucht- und Aminosäuren inklusive interner Standards ausgegeben.

Im Programm für die Datenanalyse von MS-Chromatogrammen wurde für jede gesuchte Verbindung ein Steckbrief erstellt, der die notwendigen Kenndaten zum Quantifizieren und Qualifizieren der Verbindung enthält. In Tabelle 4.10 sind sie am Beispiel der Äpfelsäure aufgeführt.

Tabelle 4.10: Daten für die automatische Peakflächen-ermittlung am Beispiel der Äpfelsäure

Name:	Äpfelsäure
Retentionszeit:	26,22 min
Zeitfenster (Toleranzbereich):	+ 0,5 bzw. – 0,5 min

Quantifizierung über ein Target-Ion

	<i>Ion</i>	<i>Intensität</i>
Target Ion	161	100 %

Qualifizierung über drei weitere Ionen

	<i>Ion</i>	<i>Intensität</i>
Q 1-Ion	89	360 %
Q 2-Ion	217	61 %
Q 3-Ion	145	76 %

Zunächst werden Name der Verbindung und die durch die Standardverbindung ermittelte Retentionszeit eingegeben. Da es durch Matrixeffekte und Schwankungen im chromatographischen System Verschiebungen der Retentionszeit geben kann, wird ein Zeitfenster angegeben, in dem die Verbindung anhand der typischen Ionen gesucht wird. Für die Quantifizierung der Verbindungen wird ein aus dem Massenspektrum der

Verbindung ermitteltes *Target-Ion* festgelegt, welches in dem angegebenen Retentionsbereich detektiert werden muß. Die Verbindung wird aber nur dann als Äpfelsäure erkannt, wenn die vorgegebenen qualitativen Bedingungen ebenfalls erfüllt werden. Diese Absicherung erfolgt über drei weitere Ionen (Q1-Q3) des Massenspektrums. Sie müssen bezogen auf das Target-Ion eine genau festgelegte Intensität haben. Nach Abscannen des Chromatogramms auf alle 35 Verbindungen wird ein Report erstellt und ausgegeben, welcher Name, Retentionszeit, Peakfläche, Übereinstimmung der Ionen u.a. Daten der Messung enthält (s. Tabelle 4.11).

Tabelle 4.11: Auszug aus dem Report der automatischen Peakflächenermittlung

Quantitation Report					
Data File :	F:\0109T16.D	Vial:	16		
Date:	Wed Sep 02 98 12	Operator:	antje		
Sample:	AS14 Klindworth	Instrument:	HP5989		
Quant Method :	C:\HPCHEM\1\METHODS\ANTJEFS.M	Title:	Fruchtsäuren		
Lfd. Nr.	Name	Retention time	Target	Area	Qvalue
3)	Tryptophan	0.00	130	N.D.	
5)	Chlorbernsteinsäure	15.55	135	666137.28 Area	95
9)	γ -Aminobuttersäure	21.53	144	45963.40 Area #	72
10)	Citronensäure	26.74	112	51274.99 Area	92
15)	Asparagin	22.55	69	17383800.48 Area	95

(#) = qualifier out of range

Ist hinter der ermittelten Peakfläche eine Raute (#) dargestellt, so ist die Übereinstimmung der Q1-Q3-Ionen unbefriedigend (in der Tabelle γ -Aminobuttersäure). Die Verbindung ist entweder durch Matrix überlagert oder nicht vorhanden und die Ionen stammen von einer anderen Substanz. Eine Überprüfung und gegebenenfalls manuelle Integration ist ratsam.

Die vollständige Methode mit den Kenndaten aller Verbindungen ist im Anhang D zusammengestellt.

4.5.2.2 Vergleichbarkeit der Messungen

Für die Entwicklung einer Screeningmethode ist es notwendig, Kriterien festzulegen, mit deren Hilfe ein Apfelsaft erkannt und von anderen Säften unterschieden werden kann. Dazu wurden insgesamt 47 Apfelsäfte verschiedener Herkunft analysiert und die

Fingerprints hinsichtlich Schwankungen untersucht. Um nun methodenbedingte Schwankungen durch unterschiedliche Verluste bei der Derivatisierung und Veränderungen der chromatographischen Bedingungen über den Untersuchungszeitraum auszugleichen, wurden jeder Probe vor der Derivatisierung 30 µl interne Standardlösung (ISTD, 1g/L) zugesetzt. Der ISTD unterliegt damit den gleichen Bedingungen bei Derivatisierung und GC-MS. Für die Fruchtsäuren und sauren Aminosäuren wurde Chlorbernsteinsäure, für die restlichen Aminosäuren Chlorphenylalanin als ISTD verwendet. Bei der Auswertung der Fingerprints wird die automatisch ermittelte Peakfläche der untersuchten Verbindung durch die Peakfläche des ISTD geteilt und so normiert. Abweichungen bei der Derivatisierung oder Messung werden damit kompensiert und die Werte der einzelnen Säfte können miteinander verglichen werden. Gleichzeitig werden fehlerhafte Analysen erkannt. Es wird davon ausgegangen, daß im Fingerprint auftretende Schwankungen dann nur noch produktbedingt sind und nicht mehr durch die Analyse entstehen.

4.5.2.3 Reproduzierbarkeit der Messungen

Die Reproduzierbarkeit der Messungen wurde durch Mehrfachbestimmungen der einzelnen Proben überprüft, aus denen für die einzelnen Verbindungen die Standardabweichungen (STABW) und die Variationskoeffizienten (Vk) der normierten Peakflächen ermittelt wurden. In Tabelle 4.12 sind die STABW und die Vk der normierten Peakflächen für die Fünfachbestimmung eines Apfelsaftes zusammengestellt. Die Vk liegen je nach Verbindung zwischen 2-10 %.

Tabelle 4.12: Standardabweichungen (STABW) und Variationskoeffizienten (Vk) eines Apfelsaftes („Wesergold“, 100 %-Saft aus Konzentrat)

Verbindung	Mittel* (n=5)	STABW	Vk [%]
Malonsäure	0,0544	0,0031	6
Fumarsäure	22,1695	1,3151	6
Glycolsäure	0,1217	0,0103	8
Milchsäure	0,0800	0,0067	8
Bernsteinsäure	0,4691	0,0396	8
Maleinsäure	11,1831	0,2751	2
Glycin	0,0097	0,0004	4
Valin	0,1559	0,0159	10
Leucin	0,0124	0,0010	8
Isoleucin	0,0085	0,0007	8
Threonin	0,1559	0,0050	3
Prolin	0,0521	0,0032	6
Asparagin	2,6674	0,1251	5
Isocitronensäure	0,0971	0,0025	3
Äpfelsäure	19,3074	0,6624	3
Methionin	0,0769	0,0013	2
Asparaginsäure	0,3820	0,0204	5
Phenylalanin	0,1377	0,0043	3
Serin	0,4595	0,0261	6
Glutaminsäure	0,3722	0,0349	9

* Mittelwert des normierten Response (Peakfläche der Verbindung / Peakfläche ISTD)

4.5.3 Untersuchung verschiedener Apfelsaftgruppen

Die 47 untersuchten Apfelsäfte wurden zunächst in Gruppen eingeteilt, um Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der Fingerprints zu erkennen. Dabei wurden die selbst aus verschiedenen Äpfeln hergestellten Säfte, naturtrübe Säfte, Direktsäfte und Säfte aus Konzentrat jeweils zusammengefaßt. Es sollten Einflüsse aufgrund unterschiedlicher Herstellung oder Herkunft auf den Fruchtsäure-Aminosäure-Fingerprint des Apfels untersucht werden.

4.5.3.1 Apfelsaft aus verschiedenen Apfelsorten (selbst gepreßt)

Insgesamt wurden 10 verschiedene Apfelsorten untersucht. Dabei wurden mehrere Früchte der gleichen Sorte zerkleinert, mit dem Mixer zu Mus verarbeitet und der austretende Saft durch Filtration gewonnen.

In Tabelle 4.13 sind die verwendeten Apfelsorten aufgeführt.

Tabelle 4.13: Untersuchte Apfelsorten

Name	Herkunftsland	Bezug
Red Delicious	Italien, Tirol	Einzelhandel
Morgenduft	Italien, Tirol	Einzelhandel
Braeburn	Südafrika	Großhandel (Fruchthof)
Golden Delicious	Griechenland	Einzelhandel (Griechenland)
Granny Smith	Griechenland	Einzelhandel (Griechenland)
Jona Gold	Griechenland	Einzelhandel (Griechenland)
Granny Smith	Deutschland	Großhandel (Fruchthof)
Nicht bekannt	Deutschland	Einzelhandel (Havelobst)
Carola	Deutschland	Einzelhandel (Werder-Obst)
Augustapfel	Deutschland	Garten

Alle aufgenommenen Fingerprints zeigen die für Apfel typischen Merkmale. Die dominierenden Frucht- und Aminosäuren, die aufgrund des höheren Response sofort ins Auge fallen, sind Fumar- und Maleinsäure im vorderen Teil des Fingerprints, Asparagin, Äpfelsäure und Asparaginsäure im mittleren Bereich.

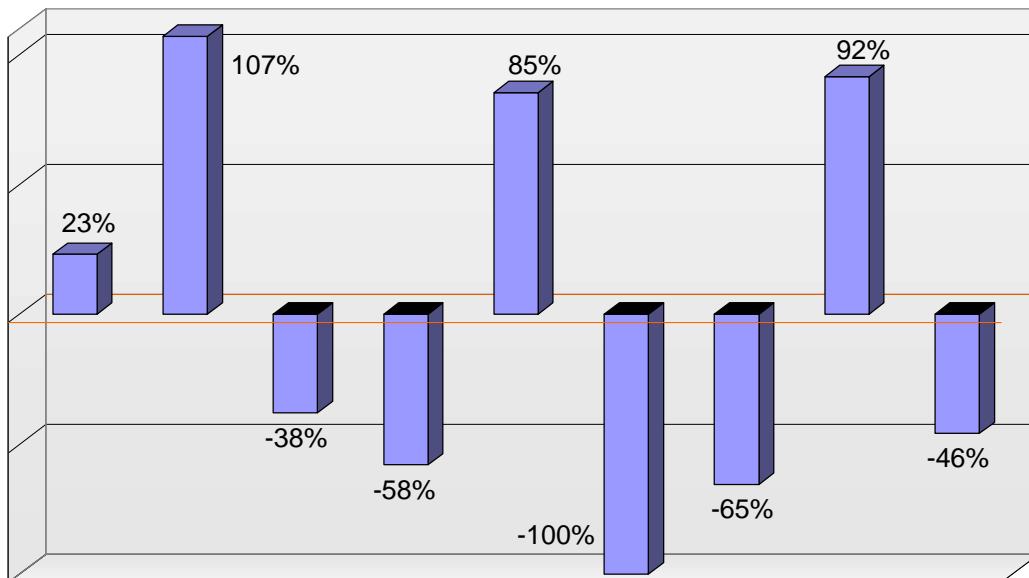
Die Summe des normierten Response aller nachgewiesenen Verbindungen schwankt zwischen 31 und 53. Die fünf genannten dominierenden Säuren machen dabei einen Anteil von 94-99 % aus.

Wie erwartet wurde in den frisch gepreßten Äpfeln keine Milchsäure nachgewiesen, da sie erst durch mikrobiellen Einfluß entsteht. Ebenfalls konnte in keinem der frischen Äpfel Glycolsäure nachgewiesen werden.

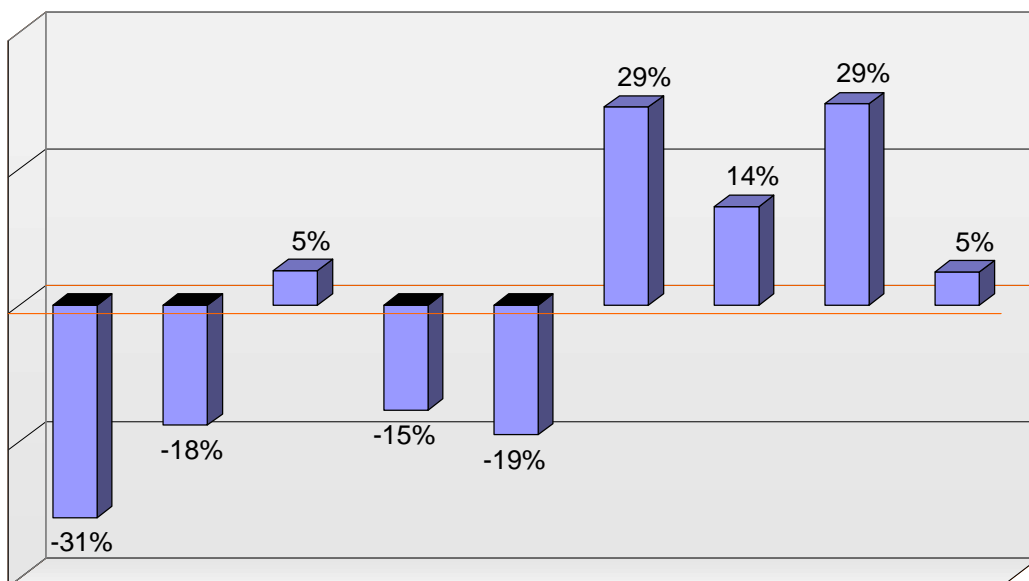
Zu den selten nachgewiesenen Säuren und Aminosäuren gehören Isocitronensäure (3x), Citronensäure (1x), Alanin (2x), Methionin (2x), Glycin und γ -Aminobuttersäure (je 3x).

Betrachtet und vergleicht man den Response einzelner Säuren in den Fingerprints der verschiedenen Äpfel, so sind mehr oder weniger starke Schwankungen zu beobachten.

In der folgenden Abbildung sind an zwei Beispielen die Abweichungen vom Mittelwert wiedergegeben. Die Schwankungen der Peakflächen von Prolin wird mit $V_k = 78\%$ als stark, die der Hauptsäure Äpfelsäure mit $V_k = 22\%$ als gering bewertet.



Prolin ($V_k = 78\%$)



Äpfelsäure ($V_k = 22\%$)

Abb. 4.21: Prozentuale Abweichungen des normierten Response vom Mittelwert in verschiedenen Apfelsorten

Obwohl die Schwankungen des Response der Einzelverbindungen unterschiedlich stark sind, wirkt sich das auf den visuellen Vergleich der Fingerprints kaum aus. Es sind zwar auch dort Schwankungen zu erkennen, jedoch weisen alle Fingerprints die für Apfel typischen Merkmale und Muster auf (s. Abb. 4.22).

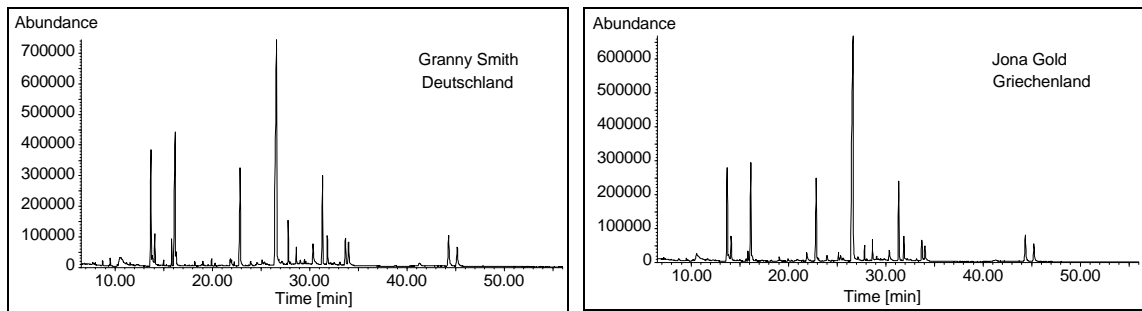
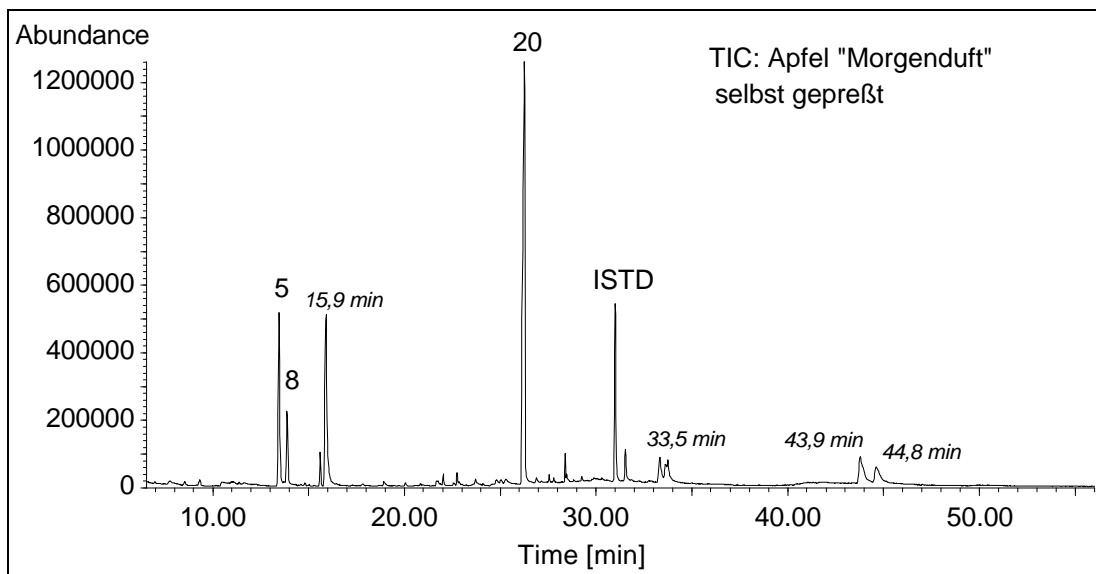


Abb. 4.22: Fingerprints zweier selbst hergestellter Apfelsäfte (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

Eine Ausnahme bildet der Apfelsaft des Apfels „Morgenduft“ aus Tirol (Italien). Der Saft ist insgesamt sehr säurearm, die Summe des normierten Response aller Frucht- und Aminosäuren beträgt nur 28.



5 = Fumarsäure, 8 = Maleinsäure, 20 = Äpfelsäure

Abb. 4.23: TIC-Chromatogramm des Apfelsaftes aus dem Apfel „Morgenduft“ aus Tirol (Italien), (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

Im Fingerprint dieses Apfels sind die für Apfel typischen Verbindungen Fumar- (5), Malein- (8)- und Äpfelsäure ebenso wie die Doppelpeaks bei $R_t = 33$ min und 44 min zu erkennen (Vgl. Abb. 4.19).

Auffällig ist aber das Fehlen des Asparaginpeaks. Diese Aminosäure gehört zu den fünf wichtigsten Verbindungen des Apfelsaft-Fingerprints und ist hier visuell kaum erkennbar. Das Gleiche gilt für die vier Aminosäuren Asparaginsäure, Phenylalanin, Serin und Glutaminsäure, die in den anderen Äpfeln gut nachweisbar waren, sie fehlen

in diesem Fingerprint. Mit Hilfe der Auswertung der für die Verbindungen typischen Ionenspuren konnten fast keine Aminosäuren nachgewiesen werden.

Dieser Apfel wurde im Januar gekauft und wurde bis dahin wahrscheinlich über längere Zeit kühl gelagert. Die niedrigen Aminosäurewerte könnten ein Hinweis darauf sein, daß der Apfel noch in unreifem Zustand geerntet und dann gelagert wurde. Die primären Aminosäuren (Glutaminsäure, Asparagin, und Asparaginsäure) mit denen die Pflanze Stickstoff fixiert, werden während der Reife in andere Aminosäuren umgebaut bzw. abgebaut [SPRÖER 1985; VOET & VOET 1994]. Eine Ernte unreifer Früchte und eine anschließende kühle Lagerung könnten dazu führen, daß kaum Aminosäuren nachweisbar sind.

Da alle anderen untersuchten selbst hergestellten Säfte aus 10 verschiedenen Äpfeln den für Apfelsaft typischen Fingerprint zeigten, wird dieser Apfel als Ausnahme gewertet. Zur Absicherung des Ergebnisses wurde dieser Saft zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt gemessen. Es wurde das gleiche Ergebnis erzielt.

4.5.3.2 Naturtrübe Apfelsäfte

Acht naturtrübe Apfelsäfte unterschiedlicher Hersteller wurden untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Säfte säurereicher sind, also mehr Frucht- und Aminosäuren pro Saft vorkommen. Damit ergibt sich eine geringfügig höhere Summe des normierten Response aller Verbindungen, die zwischen 43-64 liegt. Außerdem wurde eine andere prozentuale Verteilung der Frucht- und Aminosäuren bezogen auf die Summe des normierten Response aller Verbindungen ermittelt.

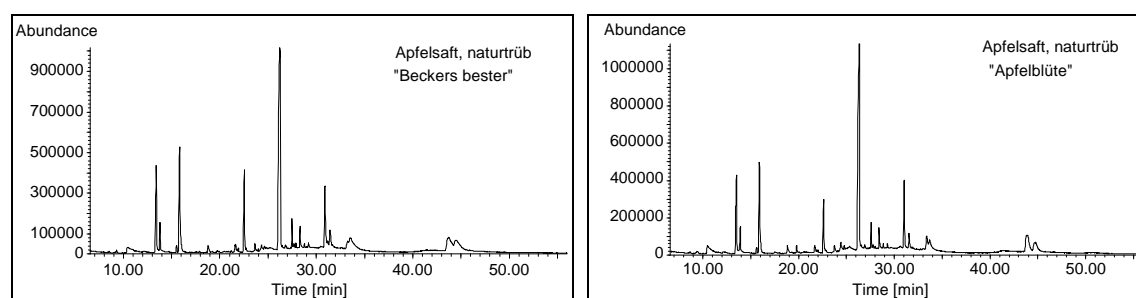


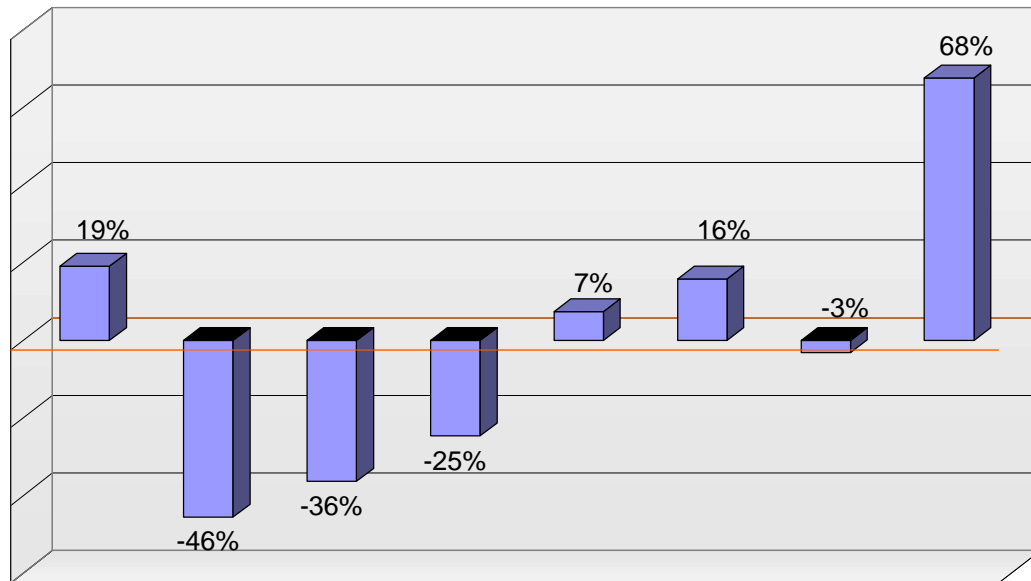
Abb. 4.24: Fingerprints zweier naturtrüber Apfelsäfte unterschiedlicher Herkunft (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

Die Fingerprints zeigen wieder das für Apfelsaft typische Muster, da es in erster Linie durch die fünf dominierenden Säuren geprägt wird. Die fünf dominierenden Säuren machen auch hier über 90 % (94-96 %) der gesamten Verbindungen aus. 99 % - wie im

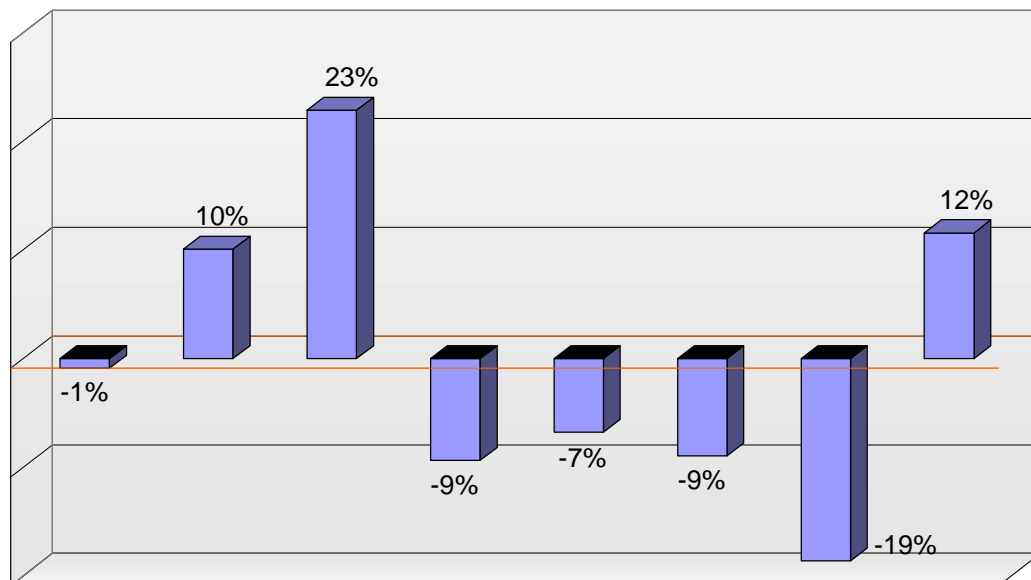
selbst hergestellten Saft - werden in diesen Säften jedoch nicht erreicht, da die restlichen Frucht- und Aminosäuren etwas stärker vertreten sind.

Milchsäure wurde in geringen Mengen in der Hälfte der Säfte gefunden. Selten wurden Alanin (1x) und Citronensäure (3x) nachgewiesen.

Die Schwankungen des Response der meisten Verbindungen sind nicht so ausgeprägt (s. Abb. 4.25), nur wenige zeigen größere Schwankungen.



Prolin (Vk = 36 %)



Äpfelsäure (Vk = 18 %)

Abb. 4.25: Prozentuale Abweichungen des normierten Response vom Mittelwert in naturtrüben Apfelsäften

Der Herstellungsprozeß hat auf den Fingerprint keinen sichtbaren Einfluß. Die absoluten Werte der Frucht- und Aminosäuren unterliegen geringeren Schwankungen

und weisen eine gleichmäßigere prozentuale Verteilung bezogen auf die Summe des normierten Response aller Verbindungen auf. Dies wird auf das Mischen verschiedener Mostapfelsorten bei der industriellen Herstellung und eine größere Homogenität bedingt durch Tanklagerung zurückgeführt.

4.5.3.3 Direktsäfte

Im einleitenden Kapitel wurde beschrieben, was unter Direktsäften verstanden wird. Es sind die Säfte, die aus den Früchten erzeugt, direkt abgefüllt und verkauft werden. Für die vorliegende Arbeit wurden sechs Direktsäfte (Probennachweis siehe Anhang G) untersucht.

Die Summe des normierten Response aller Verbindungen erreicht ähnliche Werte wie die der selbst hergestellten Apfelsäfte, sie sind also etwas säureärmer als die naturtrüben Säfte. Sie liegt zwischen 39-57. Ansonsten entsprechen die Verhältnisse denen in naturtrüben Apfelsäften, die fünf wichtigen Verbindungen machen 94-96 % aller Verbindungen aus, selten werden die Verbindungen Alanin, Citronensäure (je 1x) und Isocitronensäure (2x) nachgewiesen. Milchsäure wird in geringen Mengen in fünf der sechs Säfte gefunden.

Die Auswirkungen der etwas geringeren Schwankungen (s. Abb. 4.27) auf das charakteristische Muster im Fingerprint von Apfelsaft sind gering, so daß der visuelle Eindruck des Fingerprints von Apfelsaft erhalten bleibt. (s. Abb. 4.26).

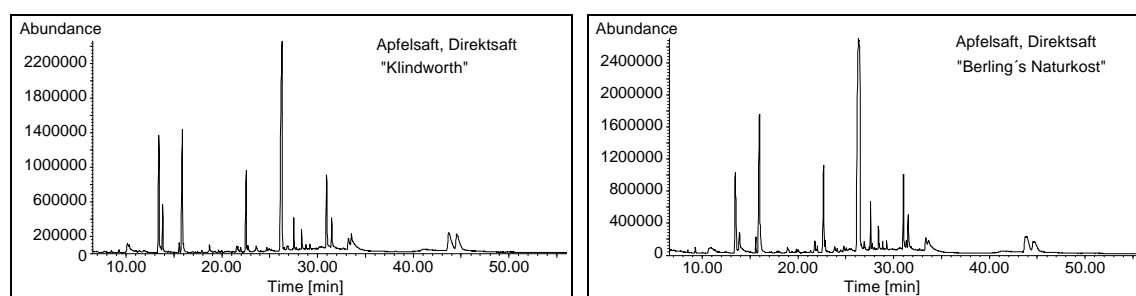
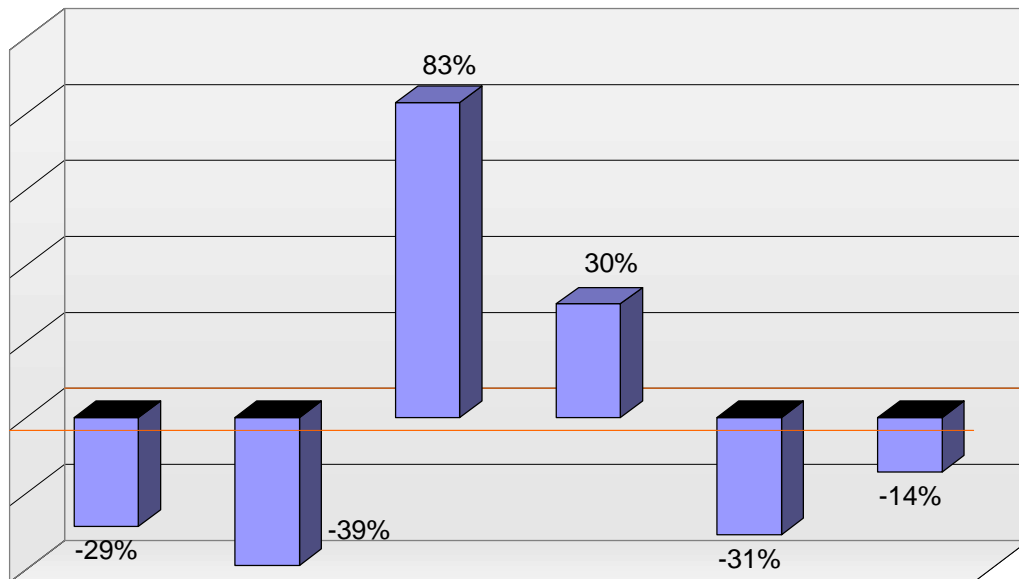
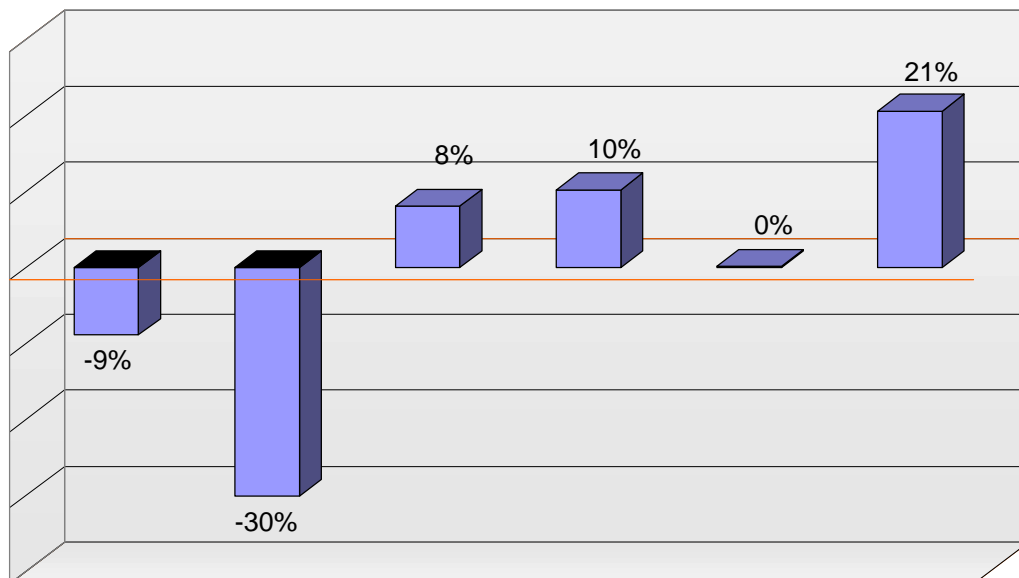


Abb. 4.26: Fingerprints zweier Direktsäfte unterschiedlicher Herkunft (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

Die Schwankungen des Response werden insgesamt durch das Mischen verschiedener Apfelsorten bei der Herstellung etwas ausgeglichen, es gibt aber auch hier Verbindungen, die eine stärkere und andere, die eine geringere Variationsbreite aufweisen.



Prolin (Vk = 40 %)



Äpfelsäure (Vk = 18 %)

Abb. 4.27: Prozentuale Abweichungen des normierten Response vom Mittelwert in Direktsäften

4.5.3.4 Säfte aus Konzentrat

Die Säfte aus Konzentrat werden durch Rückführung des bei der Herstellung entzogenen Wassers und der aufgefangenen Aromastoffe gewonnen. Es ist also ein weiterer Verfahrensschritt, der sich auf das Fruchtsäure-Aminosäure-Muster der Säfte auswirken kann. Es wurden insgesamt 22 Apfelsäfte aus Konzentrat verschiedener Hersteller untersucht.

Bei der Untersuchung ist aufgefallen, daß die Summe des Response der Verbindungen, die nachgewiesen wurden deutlich, höher liegt als in den bisher betrachteten Apfelsaftgruppen. Sie liegt zwischen 50 und 80, die Säfte sind also im Vergleich reicher an Frucht- und Aminosäuren. Die Verhältnisse der Säuren untereinander und damit die typischen Muster des Fingerprints sind aber erhalten, so daß auch durch diesen Herstellungsprozeß kein Einfluß auf den Fingerprint zu erkennen ist.

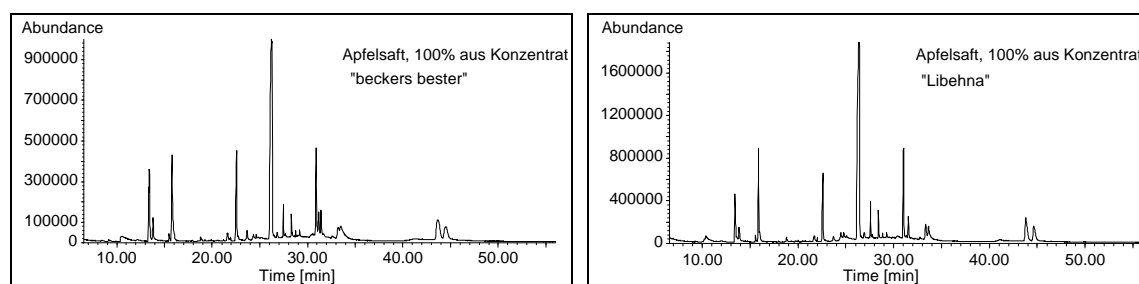


Abb. 4.28: Fingerprints zweier Apfelsäfte aus Konzentrat unterschiedlicher Herkunft (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

Die fünf dominierenden Säuren weisen auch in den Säften aus Konzentrat einen Anteil von 94-97 % des Gesamtresponse auf, selten nachweisbar sind Citronensäure (3x) und Glycin (5x). Alanin konnte in diesen Säften nicht nachgewiesen werden. In fast allen Säften konnten Spuren von Milchsäure gefunden werden.

Die Schwankungen des normierten Response der Verbindungen sind vergleichbar mit denen der anderen Säfte. Die Abweichungen von Äpfelsäure sind mit $V_k = 29\%$ stärker als in den anderen untersuchten Gruppen.

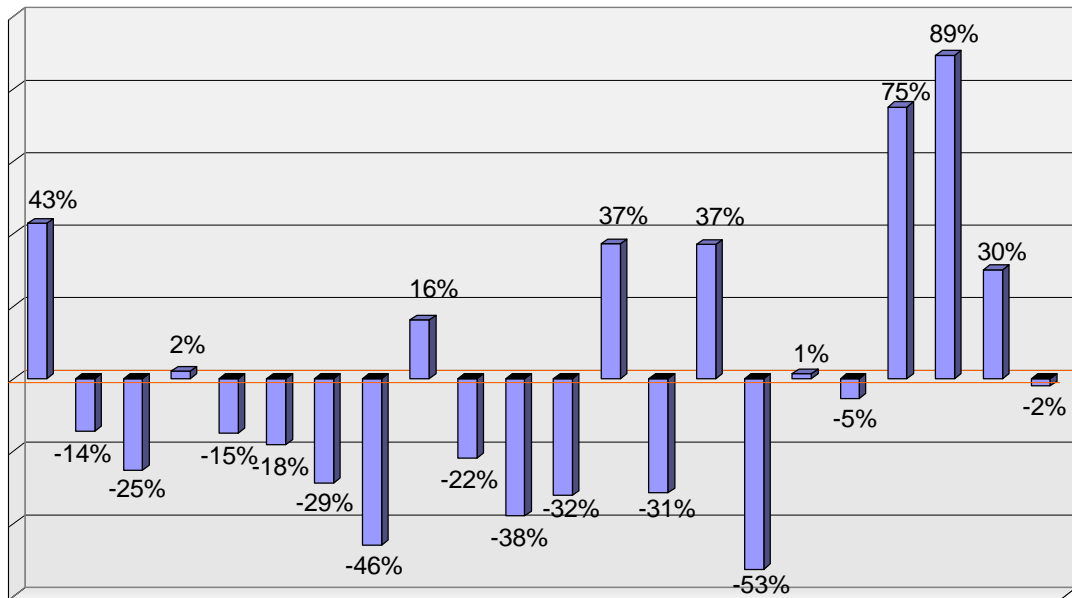
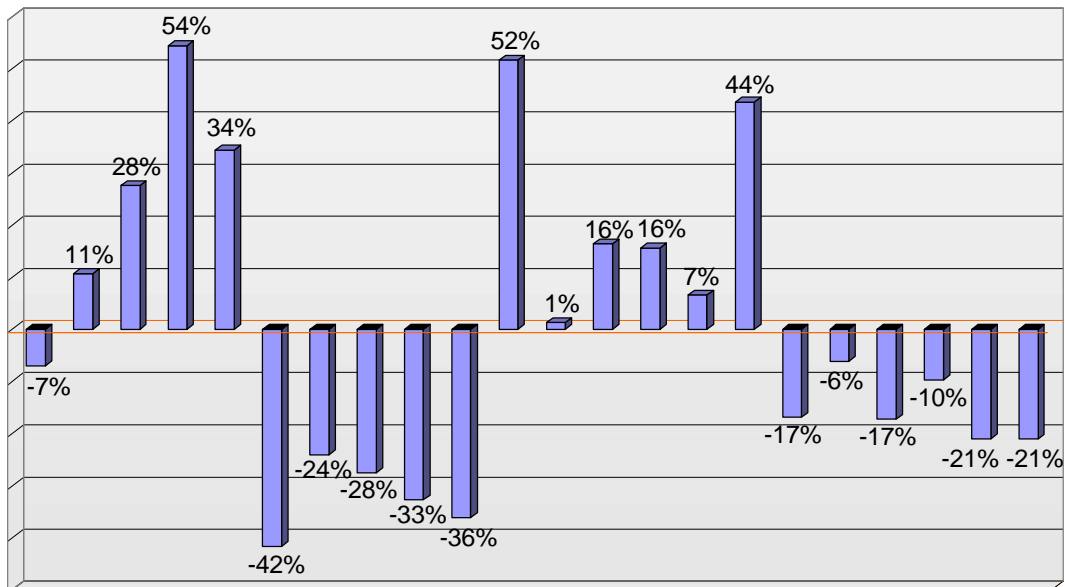
Prolin (V_k = 38 %)Äpfelsäure (V_k = 29 %)

Abb. 4.29: Prozentuale Abweichungen des normierten Response vom Mittelwert in Apfelsäften aus Konzentrat

4.5.4 Zusammenfassender Vergleich der Gruppen

Für die Entwicklung eines Screeningverfahrens war es notwendig gewesen, verschiedene Apfelsaftgruppen zu untersuchen, um Einflüsse hinsichtlich Herstellung, Herkunft oder Art des Saftes auf das Fruchtsäure-Aminosäure-Muster des Apfelsaftes im Vorfeld durch Betrachtung der Fingerprints festzustellen.

Für alle Gruppen konnten fünf Verbindungen als dominierend oder bedeutend dargestellt werden, die ca. 94-99 % des Gesamtresponse der untersuchten Frucht- und

Aminosäuren ausmachen. Dies sind die Fruchtsäuren Äpfel-, Fumar- und Maleinsäure und die Aminosäuren Asparagin und Asparaginsäure.

Von den insgesamt 23 im Apfelsaft nachweisbaren Verbindungen haben 17 Verbindungen nur einen Anteil von max. 6 % auf den Gesamtresponse. Dies bestätigt auch die in Kapitel 4.5.1 gegebene Beschreibung des Apfelsaft-Fingerprints, in dem nur wenige dominierende Peaks das typische Muster ausmachen. Er ergibt also stets ein sehr einfaches und unverraushtes Chromatogramm mit wenigen Peaks.

Vergleicht man einzelne Werte miteinander, so sind zwischen den Gruppen doch einige Unterschiede zu verzeichnen. Im selbst gepressten Apfelsaft konnten insgesamt weniger Verbindungen nachgewiesen werden, wodurch die fünf Hauptkomponenten dort auch einen Anteil von bis zu 99 % des Gesamtresponse erreichen, was in den industriell hergestellten Säften nicht beobachtet werden konnte.

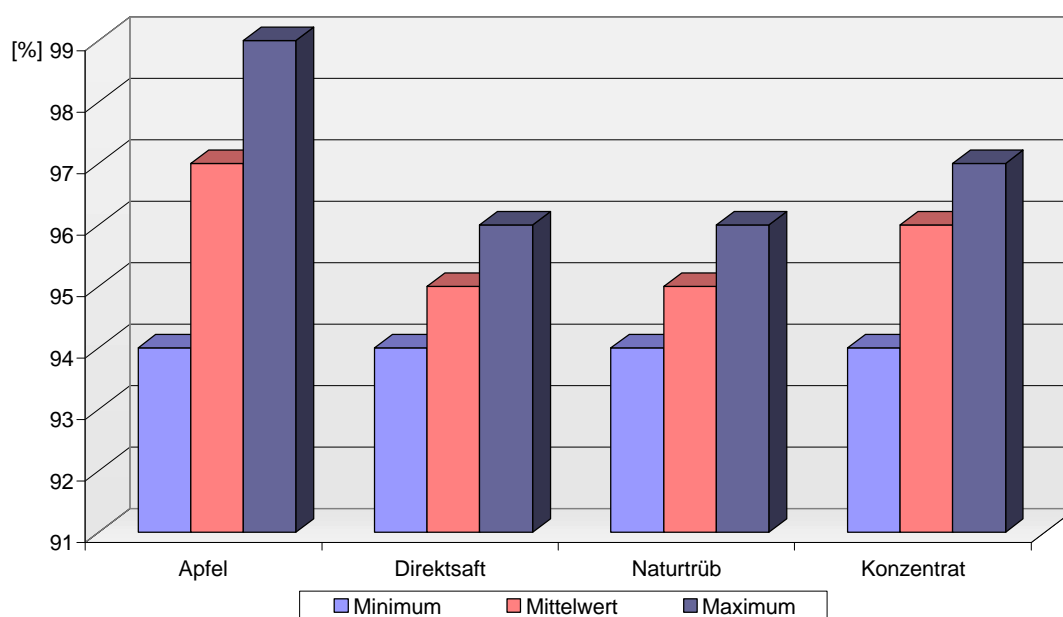


Abb. 4.30: Vergleich des prozentualen Anteiles der Majorkomponenten am Gesamtresponse in den verschiedenen Apfelsaftgruppen

Die selbst hergestellten Säfte sind säureärmer, die aus Konzentrat am säurereichsten, was sich in der Summe des Response aller Verbindungen widerspiegelt.

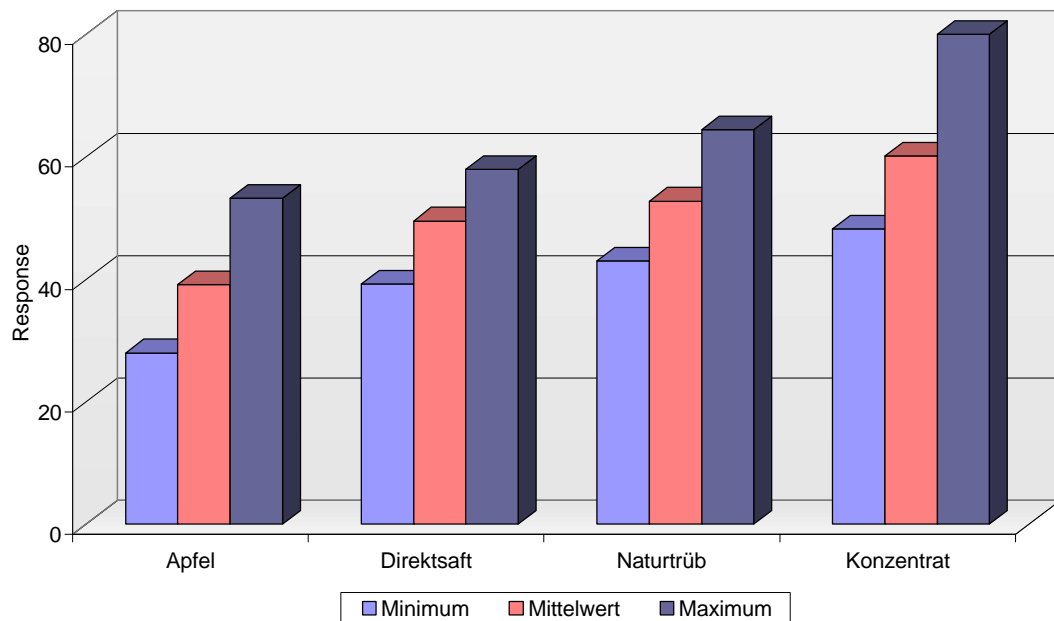


Abb. 4.31: Vergleich der Summe aller gemessenen Verbindungen in den verschiedenen Apfelsaftgruppen

Der oben beschriebene Trend ist auch sehr deutlich an den Peakflächen für die Hauptsäure Äpfelsäure zu erkennen. Ihr Vorkommen ist im selbst gepressten Saft einzelner Apfelsorten geringer als in den industriell hergestellten Säften. Im Saft aus Konzentrat wurden die höchsten Werte gemessen.

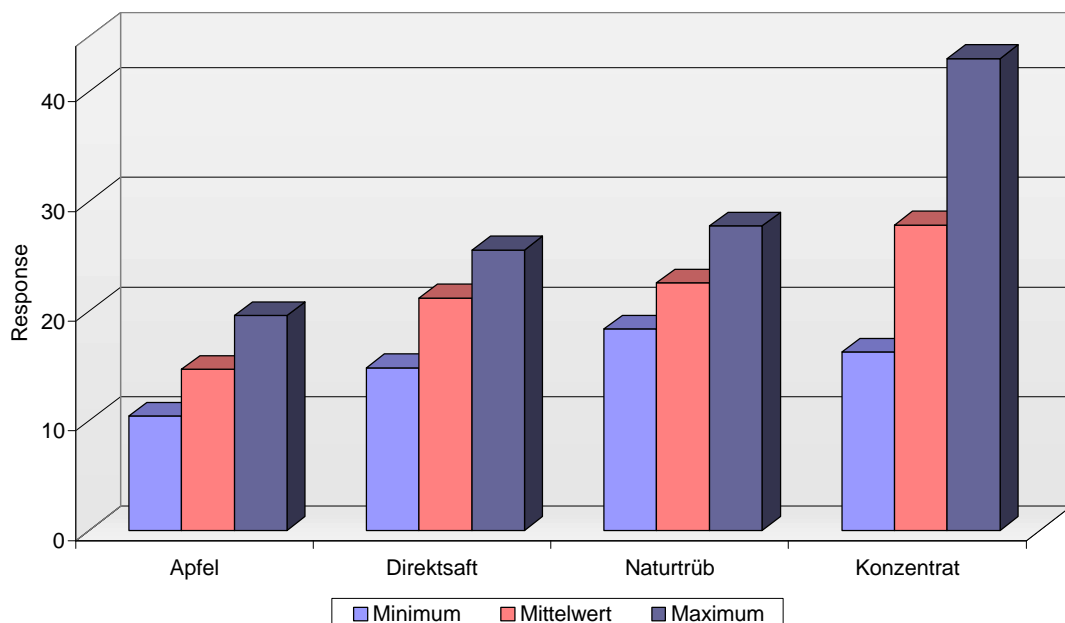


Abb. 4.32: Vergleich des normierten Response der Äpfelsäure in den verschiedenen Apfelsaftgruppen

Abgesehen von den Unterschieden einzelner Response-Werte konnte gezeigt werden, daß keine signifikanten Einflüsse auf den Fingerprint erkennbar sind, in dem die Relationen der Säuren wiedergegeben sind. Das für Apfel typische Muster der Säuren verändert sich nicht durch die verschiedenen untersuchten Einflüsse der Herstellung.

Abschließend kann festgestellt werden, daß für alle untersuchten Apfelsafttypen gleich welcher Herkunft oder Herstellungsart ein für Apfelsaft typischer Fingerprint erkennbar ist, der ein Screening sinnvoll macht. Es sollte möglich sein, anhand des Fingerprints bzw. der Abweichungen hiervon, Apfelsaft als solchen bzw. Verfälschungen mit artfremden Säften zu erkennen.

Im Folgenden sollen aus dem typischen Apfelsaft-Fingerprint, welcher auf den Werten von 47 Säften basiert, Kriterien für ein Apfelsaftprofil abgeleitet werden. Sie stellen die Voraussetzung für ein rechnergestütztes Erkennen des Apfelsaftes dar.

4.5.5 Entwicklung des Apfelsaftprofils zur rechnergestützten Fingerprint-erkennung

Auf der Basis des während der Auswertung der TIC-Chromatogramme ermittelten und normierten Response für die Frucht- und Aminosäuren werden im Folgenden Kriterien erarbeitet, die für einen authentischen Apfelsaft gelten sollen und daher erfüllt werden müssen. Diese Kriterien stellen das Profil des Apfelsaftes dar, welches während eines Screenings von Säften als Filter eingesetzt wird. Dabei sollen Säfte mit Abweichungen vom Apfelsaftprofil erkannt und herausgefiltert werden.

Der Filter soll anhand der Kriterien Apfelsaft als solchen erkennen, aber ebenso jede Veränderung des Profils, sei es durch mikrobiellen Verderb oder durch Verfälschung mit anderen Säften, bemerken.

Die Kriterien, die nachfolgend erläutert werden, sind so gewählt, daß sie von mindestens 95 % der untersuchten Apfelsäfte erfüllt werden.

4.5.5.1 *Negativ-Komponenten*

Von den insgesamt 35 untersuchten Verbindungen konnten im Apfelsaft 23 Frucht- und Aminosäuren nachgewiesen werden. Unter den *Negativ-Komponenten* werden solche verstanden, die in keinem der Apfelsäfte nachgewiesen wurden. Dazu gehören:

- Benzoe-, Salicyl-, Glutar-, Sorbin-, Oxal- und Weinsäure
- Glutamin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin, Lysin

Diese Verbindungen müssen im authentischen Apfelsaft negativ sein, ihr Nachweis deutet auf eine Verfälschung mit artfremden Saft oder Proteinhydrolysat hin.

4.5.5.2 *Majorkomponenten*

In den vorangegangenen Kapiteln wurden verschiedene Gruppen von Apfelsäften untersucht, wobei sich fünf der 23 nachgewiesenen Verbindungen als Hauptkomponenten erwiesen haben. Sie dominieren im Fingerprint und werden als *Majorkomponenten* bezeichnet. Von den untersuchten Verbindungen machen sie einen Anteil von mindestens 94 % des Gesamtresponse aus.

Die Majorkomponenten sind:

- Fumar-, Malein- und Äpfelsäure
- Asparagin und Asparaginsäure.

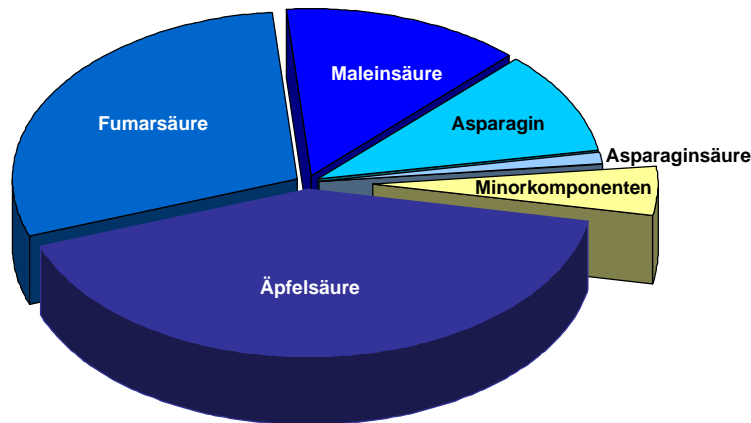


Abb. 4.33: Anteil der Majorkomponenten am Gesamtresponse der untersuchten Frucht- und Aminosäuren

Ausschlaggebend für eine Fingerprintanalyse sind die Relationen der Verbindungen zueinander. Aus ihnen können Kriterien für das Apfelsaftprofil abgeleitet werden.

Bei der genaueren Untersuchung der Verhältnisse des normierten Response der Majorkomponenten zueinander wurde festgestellt, daß *Äpfelsäure* mindestens einen Anteil von 32 % des Gesamtresponse der Majorkomponenten hat.

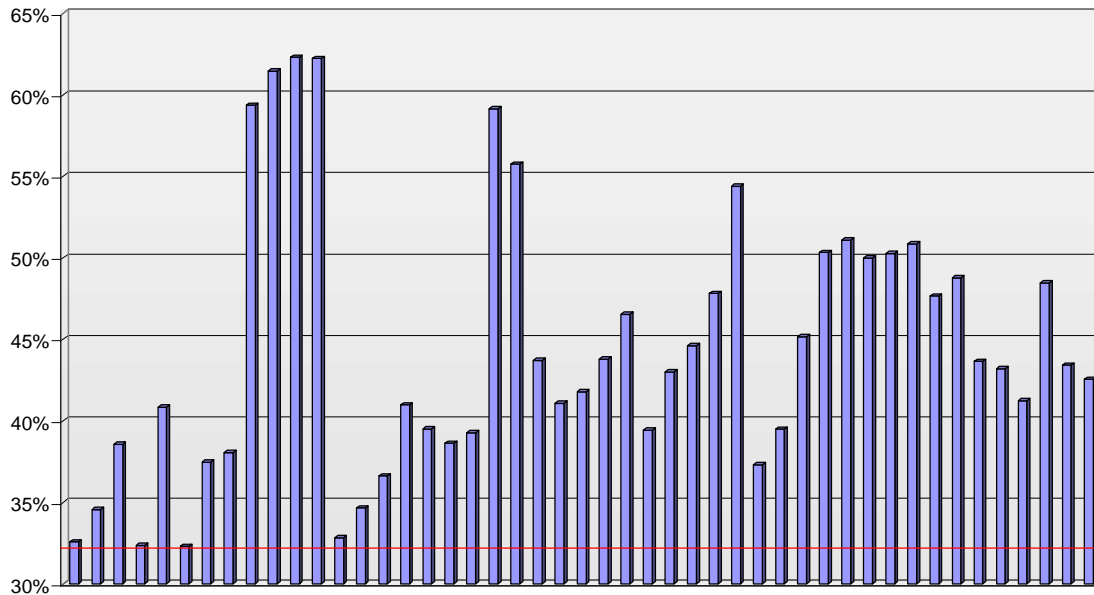


Abb. 4.34: Anteil des Response der Äpfelsäure am Response der Majorkomponenten bei den untersuchten Apfelsäften

Aus Abb. 4.34 ist zu erkennen, daß alle untersuchten Säfte trotz starker Schwankungen dieses Kriterium erfüllen.

Weiterhin ist der Anteil der *Fumarsäure* stets größer als der von *Maleinsäure*, die Summe des Response der beiden beträgt wenigstens 33 %.

Der Anteil des *Asparagins* an den Majorkomponenten ist stets größer als 2 % des Gesamtresponse der Majorkomponenten und immer kleiner oder gleich dem Maleinsäureanteil. Der absolute normierte Response sollte mindestens 1,16 aufweisen. In der Abb. 4.35 ist der absolute normierte Response des Asparagins in allen untersuchten Apfelsäften dargestellt und es ist zu sehen, daß nur einer der untersuchten Säfte diesen Minimalwert nicht erreicht, die restlichen 98 % der Apfelsäfte erfüllen jedoch dieses Merkmal.

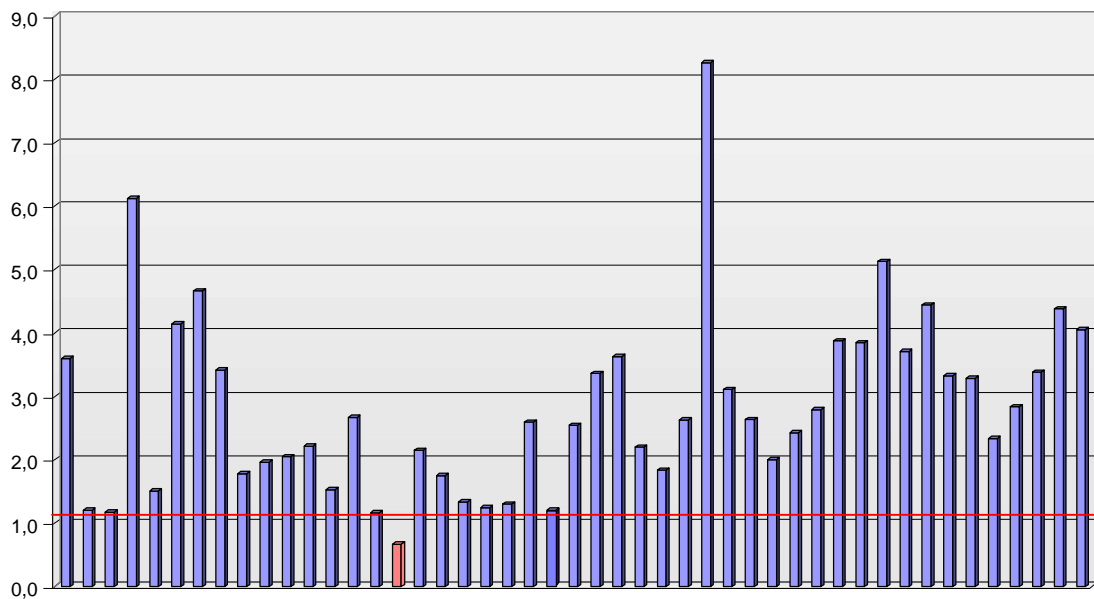


Abb. 4.35 Absoluter normierter Asparaginresponse in den untersuchten Apfelsäften

Der Saft, der den Mindestwert des absoluten Response für Asparagin nicht erreicht, (aus Tirol), er wird als Ausnahme gewertet.

Den kleinsten prozentualen Anteil des Response der Majorkomponenten hat die Maleinsäure mit höchstens 3 %. Ihr Anteil ist stets kleiner als der von Asparagin.

Minorkomponenten

Die Minorkomponenten stellen 1 % des Response der untersuchten Frucht- und Aminosäuren aus. Sie werden als

-

-

γ -Aminobuttersäure, Prolin,

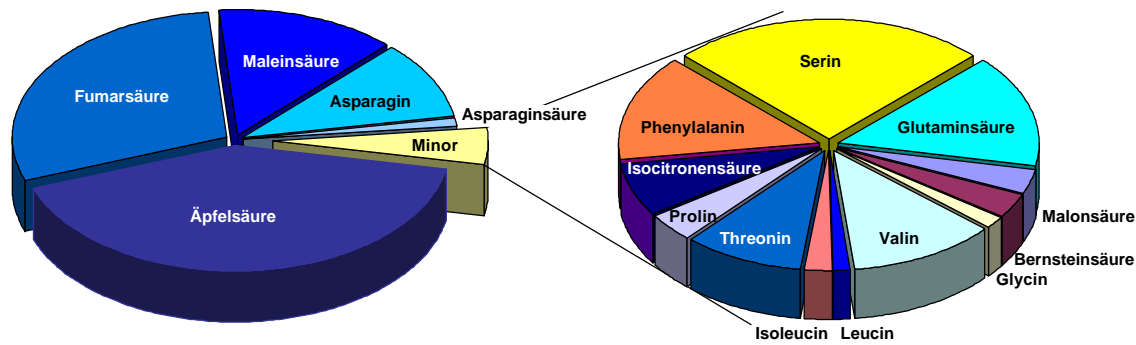


Abb. 4.36: Anteil der Minorkomponenten am Gesamtresponse der Frucht- und Aminosäuren am Beispiel eines Apfelsaftes

Die Minorkomponenten werden nicht in jedem Saft nachgewiesen, sondern sind in dem einen oder anderen Saft auch nicht enthalten. In Abb. 4.36 sind die prozentualen Verhältnisse des Response der Säuren eines Apfelsaftes anhand eines Kreisdiagrammes verdeutlicht. (Die Verbindungen, die in diesem Saft einen Anteil von 0 % aufweisen, daß heißt nicht detektiert wurden, sind nicht im Diagramm benannt.)

Obwohl oder gerade weil die Minorkomponenten nur einen sehr geringen Anteil des Response ausmachen, sind sie für das Profil des Apfelsaftes von entscheidender Bedeutung. Kleine Änderungen des Response einzelner Minorkomponenten haben bereits große Auswirkungen auf die Verhältnisse des Response der Komponenten zueinander und damit auf das Apfelsaftprofil. Durch die Ermittlung von Maximalwerten des Response konnte das Apfelsaftprofil weiter präzisiert werden. Minimalwerte können nicht angegeben werden, da die Minorkomponenten in einigen Säften - wie bereits erwähnt - auch nicht enthalten sein können. Das Fehlen dieser Verbindungen kann daher nicht als Kriterium für eine Verfälschung oder Verdünnung herangezogen werden.

Für einige Minorkomponenten wurden bestimmte Kriterien festgelegt, die von einem reinen Apfelsaft eingehalten werden müssen. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um jene, die bei der qualitativen Betrachtung der verschiedenen Fruchtarten als wichtige Unterscheidungsmerkmale auffielen. Die prozentualen Angaben beziehen sich in diesem Fall auf die Summe des Response der Minorkomponenten.

Zu diesen Minorkomponenten gehört das *Phenylalanin*, dessen Anteil des Response maximal 15 % betragen darf. Im Apfelsaft ist der Anteil des Response des Phenylalanins zudem immer größer als der Anteil des Response von Prolin. Der

absolute normierte Response des Phenylalanins darf den Wert 0,22 nicht übersteigen (Abb. 4.37).

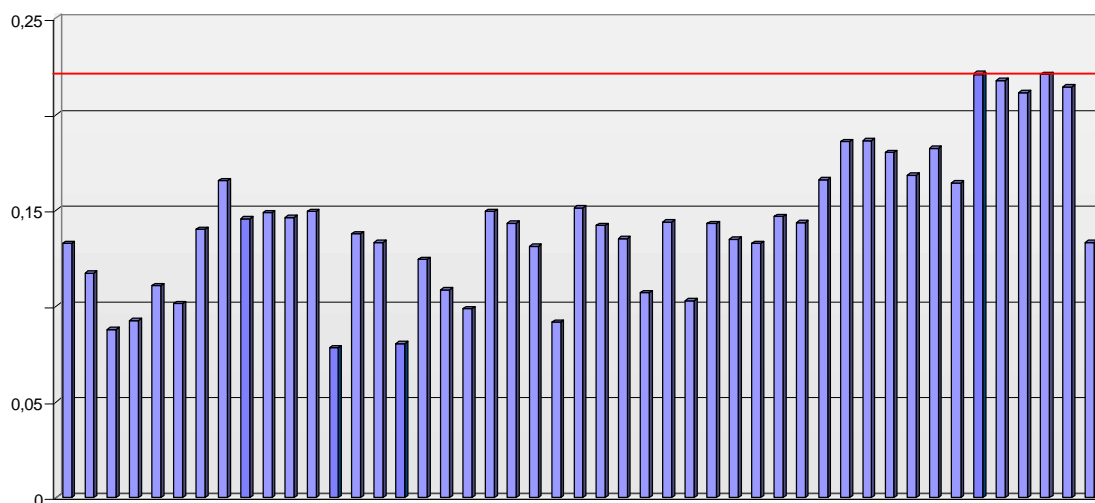


Abb. 4.37: Normierter Phenylalaninresponse (absolut) in den untersuchten Apfelsäften

Prolin hat einen Anteil des Response an den Minorkomponenten von maximal 6 % und einen maximalen absoluten normierten Response von 0,11. In einem der untersuchten Säfte, es handelt sich dabei um einen naturtrüben Direktsaft, wird dieser Wert überstiegen. 98 % der Säfte halten diesen Maximalwert ein.

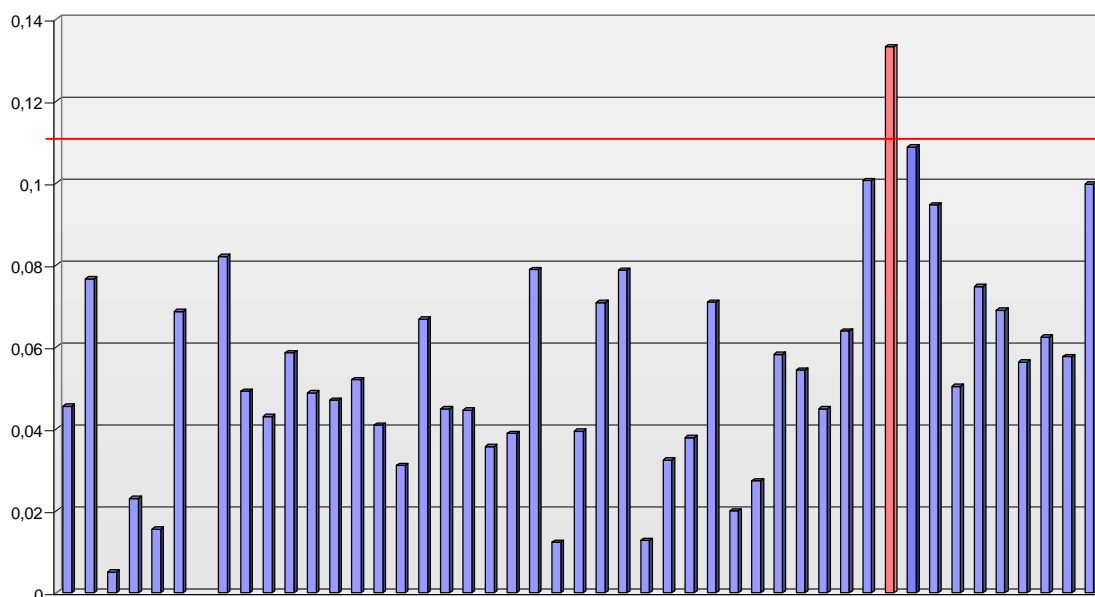


Abb. 4.38: Normierter Prolinresponse (absolut) in den untersuchten Apfelsäften

Eine weitere wichtige Minorkomponente ist das *Valin*. Der Anteil des Response von Valin darf nicht größer als 10 % sein, der absolute normierte Response den Wert 0,19

nicht übersteigen. Lediglich ein Saft –wiederum der naturtrübe Direktsaft- übertritt mit 0,27 diesen Grenzwert deutlich, die restlichen 98 % erfüllen das Merkmal.

Das Verhältnis des Response von *Isocitronensäure* zu *Citronensäure* ist beim Vergleich der Kern- und Steinobstsäfte im Kapitel 4.4.2 ebenfalls aufgefallen und soll daher genau festgelegt werden. Bei der Untersuchung der verschiedenen Apfelsäfte konnte festgestellt werden, daß der Anteil des Response der Citronensäure immer kleiner ist als der von Isocitronensäure und 7 % nicht übersteigt. Ein nicht deklariertes Zusatz von Citronensäure oder eine Verfälschung mit einem citronensäurereichen Saft sollte sich durch die Veränderung dieses Verhältnisses offenbaren.

Milchsäure ist ein Zeichen für mikrobielle Veränderungen des Saftes bzw. kann die Verwendung verdorbener Früchte bedeuten. Daher sollte der Anteil des Response 25 % nicht übersteigen bzw. der absolute normierte Response nicht größer als 0,5 (entspricht 500 mg/l⁴) sein. Beim Überschreiten dieser Werte wird eine Quantifizierung der Milchsäure in einer erweiterten Analyse empfohlen.

⁴ Laut RSK-Werten für Apfelsaft sind maximal 0,5 g/l Milchsäure bezogen auf die titrierbare Gesamtsäure normal.

4.5.5.4 Das Apfelsaftprofil

Aus den gezeigten Abbildungen gehen deutliche Schwankungen der einzelnen Werte hervor, die bei der Festlegung der Kriterien berücksichtigt werden mußten. Trotz dieser Schwankungen bleibt ein für Apfelsaft einmaliger Fingerprint erhalten, der in Tabelle 4.14 als Apfelsaftprofil fixiert ist.

Tabelle 4.14: Kriterien im Apfelsaftprofil

1. Negativkomponenten	
Benzoessäure	-
Salicylsäure	-
Glutarsäure	-
Sorbinsäure	-
Oxalsäure	-
Weinsäure	-
Glutamin	-
Histidin	-
Tryptophan	-
Tyrosin	-
Lysin	-
2. Majorkomponenten	
Anteil am Gesamtresponse	$\geq 94 \%$
	<i>Bezug Majorkomponenten</i>
Äpfelsäure	$\geq 32 \%$
Fumar- + Maleinsäure	$\geq 33 \%$
Fumarsäure > Maleinsäure	
Asparagin	$> 2 \%$
Asparagin < Maleinsäure	
Asparaginresponse	$\geq 1,16^*$
Asparaginsäure	$\leq 3 \%$
Asparaginsäure < Asparagin	
3. Minorkomponenten	
Anteil am Gesamtresponse	$\leq 6 \%$
	<i>Bezug Minorkomponenten</i>
Phenylalanin	$\leq 15 \%$
Phenylalanin > Prolin	
Phenylalaninresponse	$\leq 0,22^*$
Prolin	$\leq 6 \%$
Prolinresponse	$\leq 0,11^*$
Valin	$\leq 10 \%$
Valinresponse	$\leq 0,19 \%$
Isocitronensäure > Citronensäure	
Citronensäure	$\leq 7 \%$
Milchsäure	$\leq 25 \%$
Milchsäureresponse	$\leq 0,5^*$

* Response-Werte (absolut) der Verbindungen

Die Beurteilung zu untersuchender Säfte kann mit Hilfe dieses erstellten Profils in einem einfachen Tabellenkalkulationsprogramm (im Folgenden Apfelsaftfilter genannt)

erfolgen. Der Apfelsaftfilter stellt eine Tabelle dar, die die Bedingungen des Profils als „WENN - DANN“ – Beziehung enthält und mit den entsprechenden Werten des zu untersuchenden Saftes verknüpft wird. Dieser Filter funktioniert wie eine Schablone für Apfelsaft. Ist der Saft authentisch und erfüllt alle Kriterien, bleiben die „Zellen“ der Tabelle leer. Sollten einige Merkmale nicht erfüllt sein, erscheint in der entsprechenden Zelle des Merkmales ein Kreuz. Sobald ein Wert die Bedingung nicht erfüllt, muß der Saft einer weiterführenden Analyse unterzogen werden. Diese Tabelle kann mit dem Auswerteprogramm der TIC-Chromatogramme verknüpft werden, so daß jeder Saft automatisch beurteilt wird.

95 % aller untersuchten Apfelsäfte erfüllen die Kriterien des Apfelsaftprofils. Der selbst hergestellte Apfelsaft des Tiroler Apfels erfüllt die Kriterien nicht und wurde schon genauer besprochen. Bei dem zweiten Saft handelt es sich um den schon genannten naturtrüben Direktsaft, der sowohl einen zu hohen Prolin- als auch einen zu hohen Valinwert aufweist. Dieser Saft sollte in einer erweiterten Analyse untersucht und geklärt werden, ob die Abweichung natürlichen Ursprungs oder aus einer Verfälschung entstanden ist.

4.5.6 Vergleich mit anderen Kern- und Steinobstsäften

Im Kapitel 4.4 wurden die Fingerprints verschiedener Obstgruppen diskutiert und dabei festgestellt, daß die Arten einer Gruppe Ähnlichkeiten aufweisen, sich aber von den anderen Gruppen deutlich unterscheiden. Das erstellte Apfelsaftprofil soll an den anderen Kern- und Steinobstsäften getestet werden, da zu diesen Obstarten die größte Ähnlichkeit und damit die höchste Wahrscheinlichkeit von Übereinstimmungen einzelner Werte zu erwarten ist.

Dazu wurden die TIC-Chromatogramme des MSD der untersuchten Säfte mit der für Frucht- und Aminosäuren entwickelten Methode im Programm ausgewertet und die Werte in eine vorbereitete Tabelle übertragen. Diese wird mit dem Apfelsaftfilter verknüpft und das Tabellenkalkulationsprogramm gibt die Beurteilung des untersuchten Saftes aus.

4.5.6.1 Kirschsafft

Für den Test mit Kirschsafft wurden drei verschiedene Kirschsäfte herangezogen. Dazu wurde aus Früchten unterschiedlicher Herkunft (s. Anhang G) Saft erzeugt und dieser derivatisiert.

Sind die Kriterien des Apfelsaftprofils gut und präzise festgelegt, sollte nach der automatischen Auswerteprozedur keiner der Säfte den Apfelsaftfilter passieren. Die Ergebnisse für die Kirschsäfte sind in Tabelle 4.15 dargestellt.

Tabelle 4.15: Anwendung des Apfelsaftfilters auf Kirschsäfte

Nr.	Kriterium	Bezug %	Werte	Kirschen		
				1	2	3
1	Major $\geq 94\%$	Gesamt	0,94	X (0,81)	X (0,80)	X (0,78)
2	Äpfelsre. $\geq 32\%$	Major	0,32			
3	Fumarsre. $>$ Maleinsre.					
4	(Fumarsre.+Maleinsre.) $\geq 33\%$	Major	0,33			
5	Asn $> 2\%$	Major	0,02	X (0)	X (0)	
6	Asn \leq Maleinsre.					
7	Asn $\geq 1,16$		1,16	X (0)	X (0)	
8	Asp $< 3\%$	Major	0,03	X (0,04)	X (0,07)	X (0,05)
9	Asp $<$ Asn			X	X	X
10	Phe $>$ Pro			X	X	X
11	Phe $\leq 15\%$	Minor	0,15			
12	Phe $\leq 0,25$		0,25			
13	Pro $\leq 6\%$	Minor	0,06	X (0,07)		X (0,19)
14	Pro $\leq 0,11$		0,11	X (1,23)	X (0,47)	X (2,71)
15	Val $\leq 0,19$		0,19		X (0,29)	X (0,33)
16	Val $\leq 10\%$	Minor	0,10			
17	Citronensre. $<$ Isocitronensre.			X	X	X
18	Citronensre. $\leq 7\%$	Minor	0,07			
19	Milchsre $\leq 25\%$	Minor	0,25			
20	Milchsre $\leq 0,5$		0,5			
21	Negativkomponenten = 0		0	X	X	X
Nicht eingehaltene Kriterien			Σ	10 X	10 X	9 X

Für die Aminosäuren wurde der international übliche „Drei-Buchstaben-Code“ verwendet (z.B. Asparagin = Asn), im Namen der Fruchtsäuren wurde „Säure“ mit „sre.“ (z.B. Milchsäure = Milchsre.) abgekürzt.

In Spalte 2 der Tabelle sind die Kriterien des Apfelsaftprofils eingetragen, in der Spalte 3 (Bezug %) stehen die Bezugsgrößen, auf die sich die prozentualen Angaben des Profils beziehen. Spalte 4 enthält die Zahlenwerte, mit denen letztlich verglichen wird und in den Spalten 5 bis 7 sind die Ergebnisse für die Kirschsäfte dargestellt. Ein

Kreuz bedeutet, wie schon erläutert, daß die Bedingung nicht erfüllt ist. Die in Klammern stehenden Werte (Istwerte) sollen den direkten Vergleich mit Apfelsaft erleichtern, um die Unterschiede deutlicher hervorzuheben.

Aus der Tabelle geht hervor, daß kein Kirschsafft die Bedingungen des Filters erfüllt. Alle drei Kirschsäfte erfüllen schon das Kriterium 1 nicht, welches den Anteil der fünf Majorkomponenten mit mindestens 94 % des Gesamtresponse der Verbindungen festlegt. Zwar sind diese Verbindungen auch im Kirschsafft die Hauptverbindungen, sie machen aber nur 80 % aus. In zwei der Säfte werden die Kriterien 5, 7 und 9 nicht erfüllt, da Asparagin in diesen Säften überhaupt nicht nachgewiesen wird. Ebenso ist der Anteil des Response der Asparaginsäure in den untersuchten Kirschsäften größer als im Apfelsaft und weicht daher vom Apfelsaftprofil deutlich ab.

Die wesentlichen Unterschiede zwischen diesen beiden Obstsaften gehen aus den Verhältnissen des Response der Minorkomponenten zueinander hervor. Prolin hat im Apfelsaft immer einen geringeren Response als Phenylalanin und darf einen Anteil von 6 % an den Minorkomponenten nicht übersteigen. In allen drei Kirschsäften wurde ein umgekehrtes Verhältnis dieser beiden Aminosäuren zueinander festgestellt und in zwei Säften ist auch der Anteil des Prolins zu hoch. Im Kirschsafft ist weit mehr Prolin enthalten als in den Apfelsäften gemessen wurde (Kriterium 14). Der für Apfel festgelegte Maximalwert des Response für Valin (Kriterium 15) wurde in zwei Kirschsäften deutlich überschritten. Des weiteren ist in allen untersuchten Kirschsäften das Verhältnis der beiden Fruchtsäuren Citronensäure-Isocitronensäure entgegen dem im Apfelsaft. Der Citronensäureresponse ist im Kirschsafft größer als der von Isocitronensäure.

Hinzu kommt, daß von den Negativkomponenten des Apfelsaftes Lysin, Histidin und Tryptophan nachgewiesen werden konnten. Auch daran ist zu erkennen, daß der untersuchte Saft kein Apfelsaft ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Unterschiede zwischen Kirsch- und Apfelsaft mit Hilfe des Apfelsaftfilters sehr deutlich werden, wobei auch gerade die Minorkomponenten die vorhergesagte bedeutende Rolle spielen. Die Ähnlichkeit der Frucht- und Aminosäuremuster im TIC-Chromatogramm beider Säfte ist aufgrund der gewählten Kriterien kaum noch erkennbar. Damit wird die Möglichkeit der Verwechslung dieser Säfte auch bei Schwankungen einzelner Werte durch den Apfelsaftfilter ausgeschlossen.

4.5.6.2 Pfirsichsaft

Für den Test mit Pfirsichsaft wurden zwei Säfte untersucht. Der Saft wurde selbst durch Zerkleinern der Früchte und Abfiltrieren des entstandenen Fruchtsaftes hergestellt. In Tabelle 4.16 sind die Ergebnisse des Tests dargestellt.

Tabelle 4.16: Anwendung des Apfelsaftfilters auf Pfirsichsäfte

Nr.	Kriterium	Bezug %	Werte	Pfirsiche	
				1	2
1	Major $\geq 94\%$	Gesamt	0,94	X (0,81)	X (0,86)
2	Äpfelsre. $\geq 32\%$	Major	0,32	X (0,24)	X (0,21)
3	Fumarsre. $>$ Maleinsre.				
4	(Fumarsre.+Maleinsre.) $\geq 33\%$	Major	0,33		
5	Asn $> 2\%$	Major	0,02		
6	Asn \leq Maleinsre.			X	X
7	Asn $\geq 1,16$		1,16		
8	Asp $< 3\%$	Major	0,03	X (0,05)	
9	Asp $<$ Asn			X	X
10	Phe $>$ Pro			X	X
11	Phe $\leq 15\%$	Minor	0,15		
12	Phe $\leq 0,25$		0,25	X (0,251)	
13	Pro $\leq 6\%$	Minor	0,06	X (0,064)	
14	Pro $\leq 0,11$		0,11	X (0,46)	X (0,24)
15	Val $\leq 0,19$		0,19	X (0,27)	X (0,191)
16	Val $\leq 10\%$	Minor	0,10		
17	Citronensre. $<$ Isocitronensre.			X	X
18	Citronensre. $\leq 7\%$	Minor	0,07	X (0,14)	X (0,19)
19	Milchsre. $\leq 25\%$	Minor	0,25		
20	Milchsre. $\leq 0,5$		0,5		
21	Negativkomponenten = 0		0	X	X
Nicht eingehaltene Kriterien			Σ	13 X	10 X

Auch Pfirsichsaft weicht in einigen Werten von den Bedingungen für Apfelsaft ab. Der Anteil der Majorkomponenten am Gesamtresponse ist vergleichbar mit dem Kirschaft bei Werten von 81 bzw. 86 %. Deutlicher Unterschied im Pfirsichsaft ist der Anteil der Äpfelsäure mit nur 21 bzw. 24 % gegenüber mindestens 32 % im Apfelsaft. Ebenso

kehrt sich bei den Majorkomponenten das Verhältnis von Asparagin zu Maleinsäure um, Asparagin hat im Pfirsichsaft einen höheren Anteil.

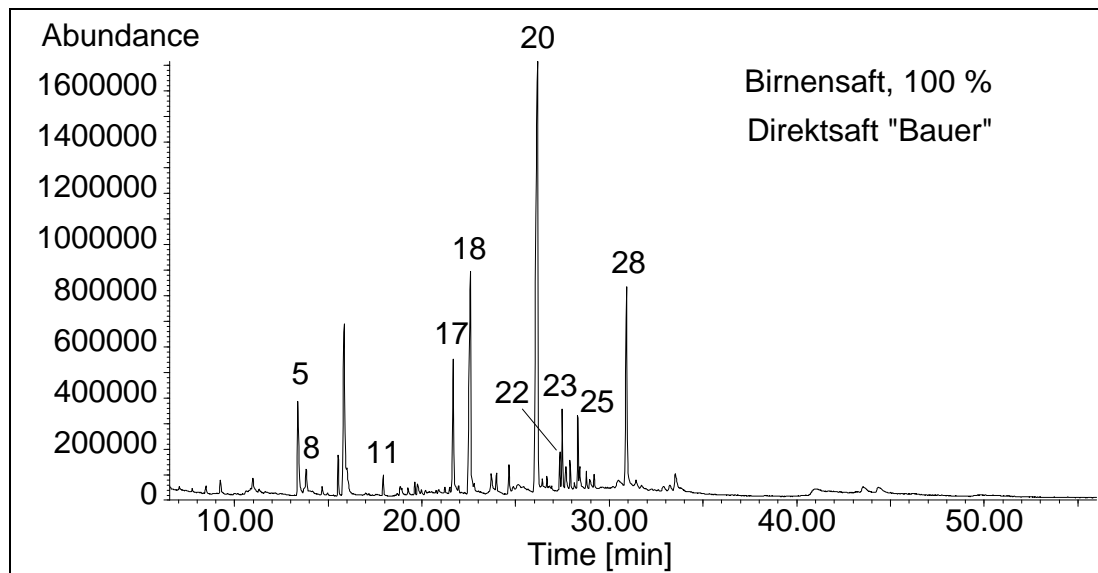
Bei den Minorkomponenten sind wiederum die Verhältnisse der Aminosäuren Prolin zu Phenylalanin und der Säuren Citronensäure zu Isocitronensäure verändert. Die Abweichungen der absoluten Werte des Response sind zum Teil nur sehr gering, der Anteil der Citronensäure an den Minorkomponenten ist dafür doppelt so hoch wie im Apfel. Es ist also deutlich mehr Citronensäure im Pfirsich enthalten. Dies bestätigt den Eindruck, der durch die visuelle Auswertung der TIC-Chromatogramme im Kap. 4.4.2 schon entstanden war.

Von den Negativkomponenten des Apfelsaftes wurden Glutamin, Histidin und Tryptophan im Pfirsichsaft nachgewiesen.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann auch eine Verwechslung dieser beiden recht ähnlichen Säfte ausgeschlossen werden. Der Apfelsaftfilter ist in der Lage auch Pfirsichsaft als „Nicht-Apfelsaft“ zu erkennen. Beide Säfte werden herausgefiltert.

4.5.6.3 Birnensaft

Beim visuellen Vergleich der Fingerprints von Apfel- und Birnensaft ist zu erkennen, daß der Birnensaft (Abb. 4.39) dem Apfelsaft am ähnlichsten ist, daher wurden insgesamt zehn Birnensäfte untersucht, die sowohl selbst aus den Früchten hergestellt, als auch aus dem Handel bezogen wurden.



5 = Fumarsäure, 8 = Maleinsäure, 11 = Valin, 17 = Prolin, 18 = Asparagin, 20 = Äpfelsäure, 22 = Citronensäure, 23 = Asparaginsäure, 25 = Phenylalanin, 28 = ISTD

Abb. 4.39: TIC-Chromatogramm eines derivatisierten Birnen-Direktsaftes, (Fa. Bauer Fruchtsaft GmbH, GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

Obwohl auch im Birnensaft große Schwankungen der Einzelwerte festzustellen sind, werden stets einige Kriterien des Apfelsaftprofils nicht erfüllt. In Tabelle 4.17 sind aus Gründen der Übersichtlichkeit die Ergebnisse von nur drei Birnensäften stellvertretend dargestellt. Die anderen Säfte verhalten sich ähnlich.

Tabelle 4.17: Anwendungen des Apfelsaftfilters auf Birnensäfte

Nr.	Kriterium	Bezug %	Werte	Birnen		
				1	2	3
1	Major $\geq 94\%$	Gesamt	0,94	X (0,80)	X (0,82)	X (0,82)
2	Äpfelsre. $\geq 32\%$	Major	0,32			
3	Fumarsre. $>$ Maleinsre.					
4	(Fumarsre.+Maleinsre.) $\geq 33\%$	Major	0,33			
5	Asn $> 2\%$	Major	0,02			
6	Asn \leq Maleinsre.			X		X
7	Asn $\geq 1,16$		1,16			
8	Asp $< 3\%$	Major	0,03			
9	Asp $<$ Asn					
10	Phe $>$ Pro			X	X	X
11	Phe $\leq 15 \%$	Minor	0,15			
12	Phe $\leq 0,25$		0,25			
13	Pro $\leq 6\%$	Minor	0,06		X (0,34)	X (0,23)
14	Pro $\leq 0,11$		0,11	X (0,45)	X (2,15)	X (1,07)
15	Val $\leq 0,19$		0,19	X (1,24)	X (0,69)	X (0,78)
16	Val $\leq 10\%$	Minor	0,10	X (0,19)	X (0,11)	X (0,16)
17	Citronensre. $<$ Isocitronensre.			X	X	X
18	Citronensre. $\leq 7\%$	Minor	0,07	X (0,25)	X (0,15)	X (0,08)
19	Milchsre. $\leq 25\%$	Minor	0,25			
20	Milchsre. $\leq 0,5$		0,5			
21	Negativkomponenten = 0		0			
Nicht eingehaltene Kriterien			Σ	8 X	8 X	9 X

Die Fingerprints von Birnensaft sind dem von Apfelsaft am ähnlichsten. Dies bestätigt sich auch nach Durchlauf des Apfelsaftfilters. Auch im Birnensaft sind die Negativkomponenten des Apfelsaftes nicht enthalten und die Majorkomponenten zeigen kaum Abweichungen. Sie erreichen aber wie schon bei den anderen beiden Obstarten lediglich ca. 80 % des Response der Gesamtverbindungen.

Die Unterschiede zwischen Birnen- und Apfelsaft werden erst bei den Minor-komponenten deutlich und sind daher im Fingerprint nicht so leicht zu erkennen. Wichtig sind dabei die Verhältnisse von Prolin zu Phenylalanin und von Citronensäure zu Isocitronensäure. Im Birnensaft ist der weitaus höhere Anteil an Prolin sehr gut zu

erkennen, der sich sowohl in der Verhältniszahl bezogen auf die Minorkomponenten (Kriterium 13) als auch im Response (Kriterium 14) ausdrückt. Ebenso hat Valin in allen untersuchten Birnensäften einen deutlich höheren Response als im Apfelsaft. Der Citronensäureanteil ist ähnlich wie im Pfirsichsaft und deutlich höher als im Apfelsaft.

In einem der untersuchten Birnensäfte wurde ein erhöhter Milchsäurewert (Response = 7,89; Grenzwert: 0,5) gemessen. Ein so hoher Wert deutet auf ein verdorbenes Produkt hin, der Saft müßte beanstandet und aus dem Verkehr gezogen werden.

Mit Hilfe des Apfelsaftfilters konnten trotz großer Ähnlichkeiten genügend Unterschiede festgestellt werden, die eine Verwechslung der Säfte ausschließen. Während in Kirsch- und Pfirsichsaft auch Unterschiede bei den Verhältnissen der Majorkomponenten aufgezeigt werden konnten, sind es im Birnensaft in erster Linie die Minorkomponenten, die eine Unterscheidung ermöglichen.

Die Kriterien die im Apfelsaftprofil festgelegt wurden und im Apfelsaftfilter Anwendung finden, erfassen offensichtlich die typischen Merkmale des Fruchtsäure – Aminosäure - Fingerprints des Apfelsaftes so genau, daß der Analytiker sehr schnell und ohne umfangreiche Erfahrungen entscheiden kann, ob ein reiner Apfelsaft oder ein Saft einer anderen Obstart vorliegt.

Da bei einem Screening auch Säfte erkannt werden müssen, die aufgrund von Mischungen mit anderen Säften oder durch Zugabe von Wasser nicht authentisch sind, soll der Apfelsaftfilter durch die Untersuchungen von Apfelsaftmischungen und -verdünnungen getestet werden.

4.5.7 Untersuchungen von Apfelsaftmischungen

Ein Apfelsaft darf per Definition nur dann als Apfelsaft in den Handel gebracht werden, wenn er ausschließlich aus Äpfeln hergestellt wurde bzw. der Saft aus Konzentrat nur mit so viel Wasser rückverdünnt wurde, wie ihm zuvor bei der Konzentrierung entzogen worden ist. Die Verwendung anderer Früchte zur Verbesserung des Geschmacks oder aus ökonomischen Beweggründen ist ebenso verboten, wie das Strecken des Saftes mit Wasser.

Nachdem festgestellt werden konnte, daß reine Säfte trotz offensichtlicher Ähnlichkeit im Fruchtsäure – Aminosäure - Fingerprint sehr gut durch das erarbeitete Apfelsaftprofil voneinander unterscheidbar sind, soll die Tauglichkeit des Apfelsaftfilters für die genannten Verfälschungsformen beim Einsatz im Screening von Fruchtsaftproben untersucht werden. Dazu wurden sowohl definierte als auch unbekannte Mischungen sowie Verdünnungen analysiert.

4.5.7.1 Verdünnungen von Apfelsaft

Für die Untersuchung von Verdünnungen wurden einem 100 %-Apfelsaft aus Konzentrat definierte Mengen destilliertes Wasser zugesetzt. Es wurden Verdünnungen mit 30, 20, 15, 10 bzw. 5 % Wasser hergestellt. In Abb. 4.40 ist das TIC-Chromatogramm der Apfelsaftverdünnung mit 30 % Wasser dargestellt.

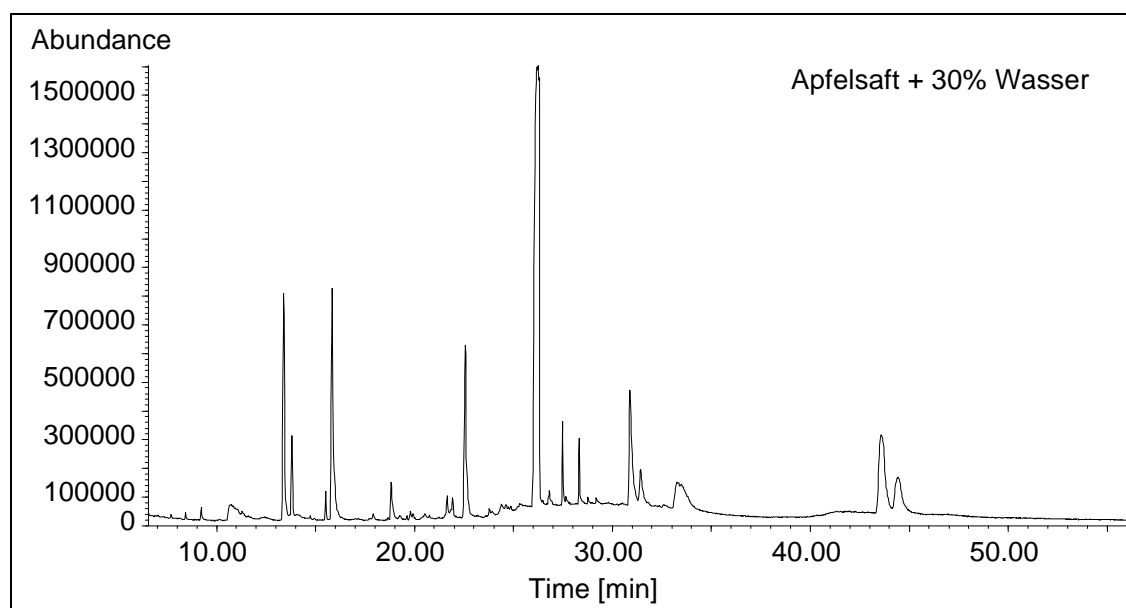


Abb. 4.40: TIC-Chromatogramm eines Apfelsaftes aus Konzentrat mit 30 % Wasser verdünnt (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

Im Chromatogramm der Apfelsaftverdünnung ist das typische Fruchtsäure-Aminosäure-Muster des Apfelsaftes zu erkennen. Ob eine Verfälschung durch Zugabe von Wasser vorliegt wird nicht sichtbar, da sich die Verhältnisse der Säuren zueinander durch Wasser nicht ändern. Durch den Apfelsaftfilter müßten die Verfälschung also anhand von Unterschreitungen von Mindestwerten aufgedeckt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.18 wiedergegeben.

Tabelle 4.18: Anwendung des Apfelsaftfilters auf definierte Verdünnungen mit Wasser

Nr.	Kriterium	Bezug %	Werte	Wasseranteil [%]				
				30	20	15	10	5
1	Major $\geq 94\%$	Gesamt	0,94					
2	Äpfelsre. $\geq 32\%$	Major	0,32					
3	Fumarsre. > Maleinsre.							
4	(Fumarsre.+Maleinsre.) > 33%	Major	0,33					
5	Asn > 2%	Major	0,02					
6	Asn \leq Maleinsre.							
7	Asn $\geq 1,16$		1,16					
8	Asp < 3%	Major	0,03					
9	Asp < Asn							
10	Phe > Pro							
11	Phe $\leq 15\%$	Minor	0,15					
12	Phe $\leq 0,25$		0,25					
13	Pro $\leq 6\%$	Minor	0,06					
14	Pro $\leq 0,11$		0,11					
15	Val $\leq 0,19$		0,19					
16	Val $\leq 10\%$	Minor	0,10					
17	Citronensre. < Isocitronensre.							
18	Citronensre. $\leq 7\%$	Minor	0,07					
19	Milchsre. $\leq 25\%$	Minor	0,25					
20	Milchsre. $\leq 0,5$		0,50					
21	Negativkomponenten = 0		0					
Nicht eingehaltene Kriterien			Σ	0 X	0 X	0 X	0 X	0 X

Aus der Tabelle geht wie schon aus dem Fingerprint hervor, daß die Verhältnisse der Säuren zueinander nicht verändert werden, sie entsprechen dem Apfelsaftprofil. Alle Bedingungen werden erfüllt, Verdünnungen bis zu einem Wasseranteil von 30 % können demnach mit Hilfe des Apfelsaftfilters nicht sichtbar gemacht werden.

Dies liegt daran, daß der einzige absolute Minimalwert (bezogen auf den normierten Response), der im Profil festgelegt wurde (Kriterium 7) nicht unterschritten wird. Aufgrund der Schwankungen der absoluten Werte der Frucht- und Aminosäuren ist die Festlegung weiterer Minimalwerte jedoch nicht möglich. Die Majorkomponenten

schwanken in so breiten Grenzen, daß sich Minimalwerte für die Einzelverbindungen oder die Summe der Majorkomponenten als nicht sinnvoll erwiesen. Bei den Minor-komponenten ist auch in den 100 % Apfelsäften ein Fehlen der einen oder anderen Säure normal, so daß dies kein Zeichen einer Verdünnung sein kann.

Aus diesen Untersuchungen wird deutlich, daß der Apfelsaftfilter auf die Verhältnisse der Frucht- und Aminosäuren zueinander ausgerichtet ist und daher Verdünnungen, bei denen diese Verhältnisse erhalten bleiben, nicht erkennen kann.

Der Einsatz des Apfelsaftfilters bei Verfälschungen von Apfelsaft durch Zugabe von Wasser ist demnach im ersten Anlauf nicht möglich.

4.5.7.2 Untersuchung eines Apfelfruchtsaftgetränkes

Die Untersuchung eines Fruchtsaftgetränkes aus Apfel sollte die Möglichkeit überprüfen, ob der Einsatz des Apfelsaftfilters die Verwendung von Äpfeln für dieses Getränk nachweisen kann. In Abb. 4.41 ist das TIC-Chromatogramm eines Apfelfruchtsaftgetränkes mit mindestens 30 % Fruchtgehalt dargestellt.

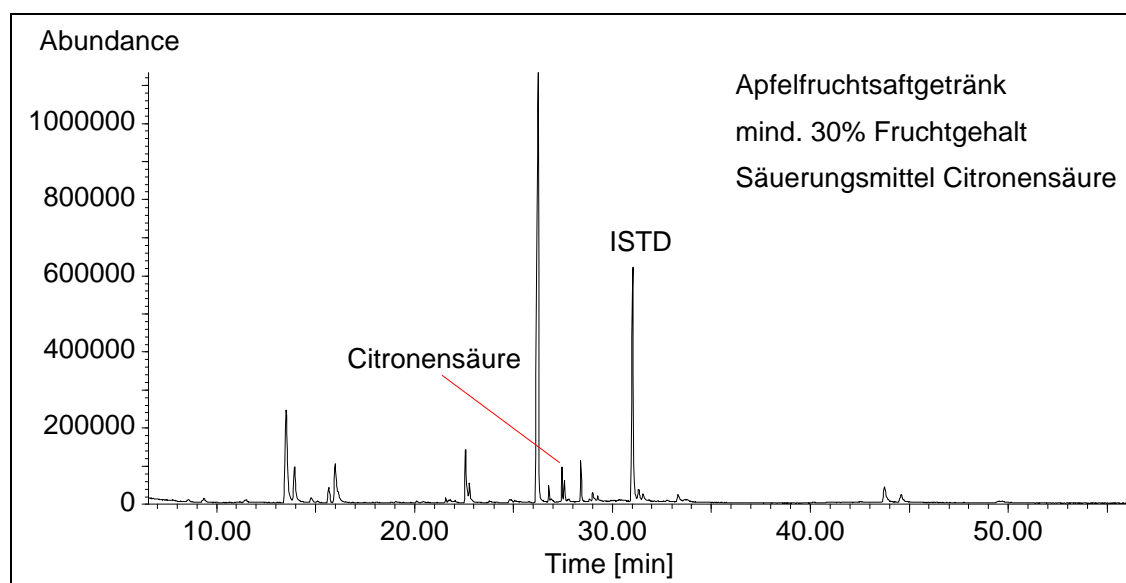


Abb. 4.41: TIC-Chromatogramm eines Apfelfruchtsaftgetränkes mit mindestens 30 % Fruchtgehalt (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

In dem Chromatogramm des Fruchtsaftgetränkes ist ein geringer Fruchtgehalt und die Zugabe von Citronensäure deutlich zu erkennen. Das typische Muster der Frucht- und Aminosäuren von Apfelsaft kann bei dieser Verdünnung kaum wahrgenommen werden, lediglich die Majorkomponenten lassen die Verwendung von Apfel vermuten. Eine visuelle Auswertung anhand des Fingerprints wie bei den 100 %-Säften ist bei diesem

Fruchtsaftgetränk nicht mehr sicher möglich. In Tabelle 4.19 sind die Ergebnisse der Überprüfung mit dem Apfelsaftfilter wiedergegeben.

Tabelle 4.19: Anwendung des Apfelsaftfilters auf ein Fruchtsaftgetränk

Nr.	Kriterium	Bezug %	Werte	Fruchtsaftgetränk (mind. 30 % Fruchtgehalt)
1	Major $\geq 94\%$	Gesamt	0,94	
2	Äpfelsre. $\geq 32\%$	Major	0,32	
3	Fumarsre. $>$ Maleinsre.			
4	(Fumarsre.+Maleinsre.) $\geq 33\%$	Major	0,33	
5	Asn $> 2\%$	Major	0,02	
6	Asn \leq Maleinsre.			
7	Asn $\geq 1,16$		1,16	X (0,62)
8	Asp $< 3\%$	Major	0,03	
9	Asp $<$ Asn			
10	Phe $>$ Pro			
11	Phe $\leq 15 \%$	Minor	0,15	
12	Phe $\leq 0,25$		0,25	
13	Pro $\leq 6\%$	Minor	0,06	
14	Pro $\leq 0,11$		0,11	
15	Val $\leq 0,19$		0,19	
16	Val $\leq 10\%$	Minor	0,10	
17	Citronensre. $<$ Isocitronensre.			X
18	Citronensre. $\leq 7\%$	Minor	0,07	X (0,55)
19	Milchsre. $\leq 25\%$	Minor	0,25	
20	Milchsre. $\leq 0,5$		0,5	
21	Negativkomponenten = 0		0	
Nicht eingehaltene Kriterien			Σ	3 X

Aus der Tabelle geht nur bei näherer Betrachtung hervor, daß in dem Fruchtsaftgetränk Apfelsaft verwendet wurde. Die Verhältnisse der Säuren zueinander bleiben erhalten obwohl drei Kriterien des Apfelsaftprofils nicht erfüllt werden.

Bei der Verwendung von nur etwa 30 % Apfelsaft wird der Minimalwert des Response für Asparagin deutlich unterschritten, der geringe Fruchtsaftanteil wird daran sichtbar. Die Verhältnisse der Majorkomponenten zueinander bleiben jedoch erhalten, was ein Hinweis auf die Verwendung von Apfelsaft ist.

Die Verhältnisse der Minorkomponenten bleiben ebenfalls weitestgehend erhalten, sie werden nur in zwei Kriterien (17, 18) nicht erfüllt. Einerseits durch die Festlegung des

Citronensäureanteils, der sehr stark überschritten wird und andererseits im Verhältnis der Citronensäure zur Isocitronensäure. Beide zeigen den Zusatz von Citronensäure als Säuerungsmittel an.

Verändern sich nur der Citronensäureanteil (Kriterium 18) und das Verhältnis von Isocitronensäure zu Citronensäure (Kriterium 17), alle anderen Bedingungen des Apfelsaftfilters werden erfüllt, muß ein Zusatz von Citronensäure angenommen werden. Citronensäure darf zugefügt werden, muß aber deklariert sein [ZUSATZSTOFFZULASSUNGS-VO 1998]. Damit gibt der Apfelsaftfilter dem Analytiker die Möglichkeit, anhand dieser beiden Kriterien einen nicht deklarierten Citronensäurezusatz nachzuweisen.

Aus den Ergebnissen der Untersuchung des Fruchtsaftgetränkes geht hervor, daß Verdünnungen nur bei einem hohen Anteil von Wasser (in dem Fruchtsaftgetränk ca. 70 %) zu erkennen sind. Ob in einem Fruchtsaftgetränk Apfel verwendet wurde oder nicht, scheint mit Hilfe eines modifizierten Apfelsaftfilters gut möglich, da wiederum die Verhältnisse der Säuren zueinander der Beurteilung zugrunde liegen. Ein Citronensäurezusatz kann anhand der Kriterien 17 und 18 nachgewiesen werden.

Da nur ein Fruchtsaftgetränk untersucht wurde, dienen die Ergebnisse lediglich als Anregung oder Beispiel. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um diese Aussagen zu verifizieren.

4.5.7.3 Mischung mit Birnensaft

Wiederholt wurde darauf hingewiesen (Kapitel 4.5.6.3), daß eine große Ähnlichkeit zwischen Apfel- und Birnensaft besteht. Daher wurden zum weiteren Test des Apfelsaftfilters zunächst definierte Mischungen mit Birnensaft hergestellt. Für die Mischungen wurde ein Apfel-Direktsaft („Herbstgold“, Fa. Libehna Fruchtsaft GmbH) und ein Birnen-Direktsaft („Beutelsbacher“, Fa. Beutelsbacher Fruchtsaftkellerei GmbH) verwendet. Der Apfelsaft wurde mit 30, 20, 15, 10 bzw. 5 % Birnensaft versetzt und analysiert. In Abb. 4.42 sind die TIC-Chromatogramme des 100 %-Apfelsaftes, des Apfelsaftes mit dem größten und dem geringsten Birnensaftanteil zum Vergleich dargestellt.

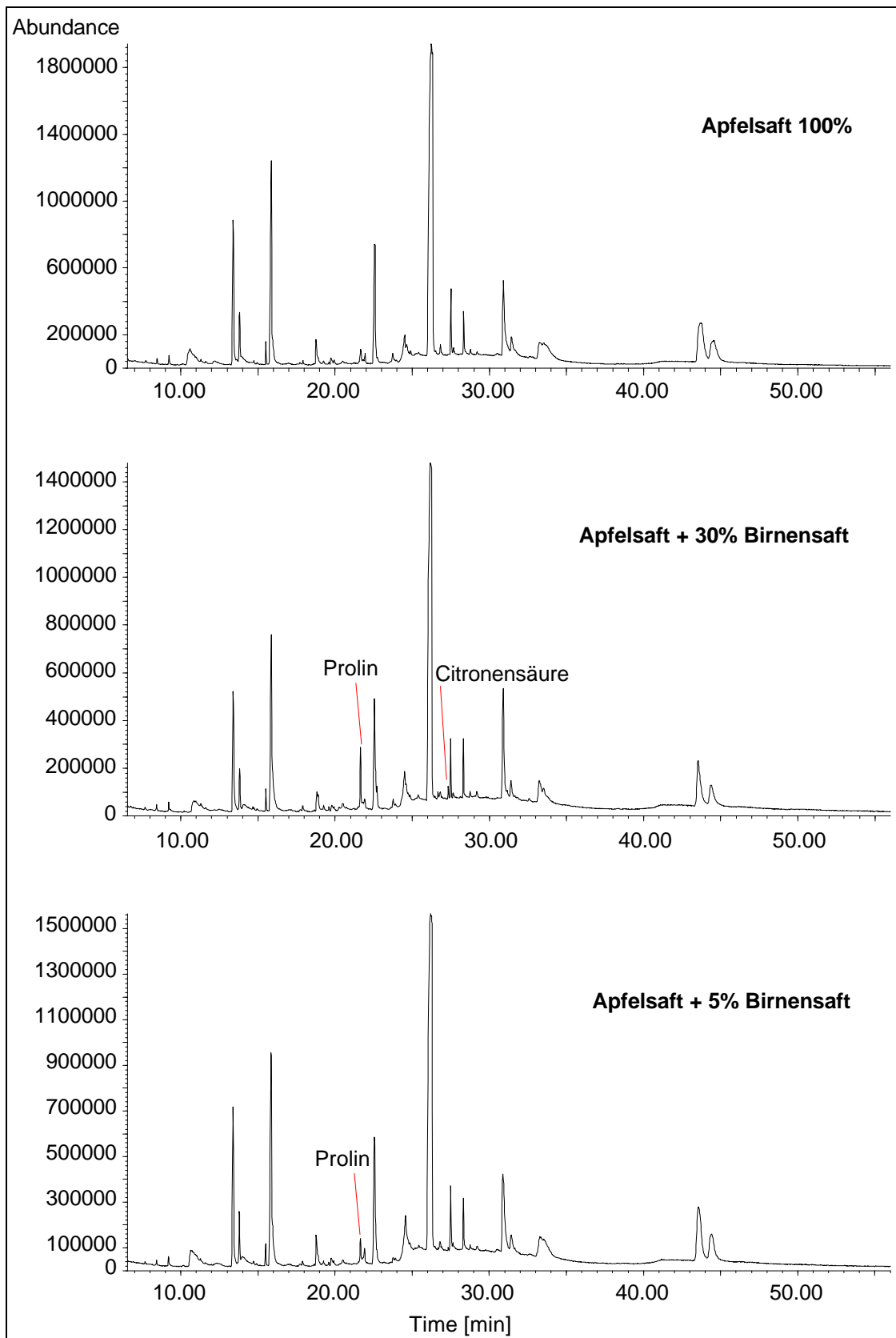


Abb. 4.42: TIC-Chromatogramme von reinem Apfelsaft und Mischungen mit 30 % und 5 % Birnensaft (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

Anhand der Chromatogramme ist zu erkennen, daß ein Zusatz von 30 % Birnensaft schon an der Veränderung des Fruchtsäure – Aminosäure – Fingerprints visuell zu erkennen ist. Am deutlichsten fällt der größere Prolinpeak ins Auge, der in reinem Apfelsaft nur als sehr kleiner Peak zu erkennen ist. Ebenso ist ein Citronensäurepeak zu sehen, der im verwendeten Apfel-Direktsaft (100 %) nicht detektiert ist. Im TIC-Chromatogramm des Apfelsaftes mit 5 % Birnensaft, ist eine Verfälschung nicht mehr sicher zu erkennen, der Prolinpeak ist etwas größer, dies fällt aber nur auf, weil der 100 %-Apfelsaft in diesem Fall bekannt ist und zum direkten Vergleich abgebildet ist. Anhand des Fingerprints könnte eine solch geringe Verfälschung nicht mehr sicher identifiziert werden.

Tabelle 4.20: Anwendung des Apfelsaftfilters auf verschiedene Mischungen von Apfelsaft mit Birnensaft

Nr.	Kriterium	Bezug %	Werte	Birnensaftanteil [%]				
				30	20	15	10	5
1	Major $\geq 94\%$	Gesamt	0,94	X (0,93)				
2	Äpfelsre. $\geq 32\%$	Major	0,32					
3	Fumarsre. > Maleinsre.							
4	Fumarsre+Maleinsre > 33%	Major	0,33					
5	Asn > 2%	Major	0,02					
6	Asn \leq Maleinsre.							
7	Asn $\geq 1,16$		1,16					
8	Asp < 3%	Major	0,03					
9	Asp < Asn							
10	Phe > Pro			X	X	X	X	
11	Phe $\leq 15\%$	Minor	0,15					
12	Phe $\leq 0,25$		0,25					
13	Pro $\leq 6\%$	Minor	0,06	X (0,21)	X (0,18)	X (0,11)	X (0,08)	
14	Pro $\leq 0,11$		0,11	X (0,73)	X (0,56)	X (0,34)	X (0,24)	X (0,16)
15	Val $\leq 0,19$		0,19	X (0,30)	X (0,28)	X (0,24)	X (0,22)	X (0,20)
16	Val $\leq 10\%$	Minor	0,10					
17	Citronensre < Isocitronensre			X	X	X	X	X
18	Citronensre. $\leq 7\%$	Minor	0,07	X (0,09)	X (0,08)	X (0,072)		
19	Milchsre. $\leq 25\%$	Minor	0,25					
20	Milchsre. $\leq 0,5$		0,50					
21	Negativkomponenten = 0		0					
Nicht eingehaltene Kriterien			Σ	7 X	6 X	6 X	5 X	3 X

Auch aus den Ergebnissen des Apfelsaftfilters (Tabelle 4.20) geht hervor, daß ein 30 % -iger Birnensaftanteil leicht zu erkennen ist. Schon der Anteil der Major-komponenten unterschreitet den vorgegebenen Wert von 94 % des Gesamtresponse. Insgesamt werden sieben Kriterien nicht erfüllt wobei die Abweichungen sehr stark sind. Bis 15 % Birnensaft bewirkt die hohe Citronensäurekonzentration im Birnensaft eine Erhöhung des Citronensäureanteils über 7 % der Minorkomponenten. Sogar ein Anteil von nur 5 % Birnensaft wird vom Apfelsaftfilter an der Verfälschung des Verhältnisses von Citronensäure zu Isocitronensäure erkannt.

Ebenso führen die hohen absoluten Response-Werte von Prolin und Valin im Birnensaft zu deutlichen Abweichungen im Apfelsaftprofil. Anhand der TIC-Chromatogramme konnte eine Verfälschung des Apfelsaftes aufgrund des hohen Prolinsignals schon vermutet werden, die Ergebnisse mit dem Apfelsaftfilter bestätigen dies. Die Abweichungen der Prolinresponse-Werte sind sehr stark und auch bei 5 % Birnensaftanteil noch eindeutig. Eine Verfälschung des Apfelsaftes anhand des Valinsignals konnte im Chromatogramm nicht erkannt werden, da Valin in beiden Säften nur ein kleines Signal verursacht. Die ermittelten Werte zeigen aber eine Abweichung und bestätigen auch noch bei 5 % Birnensaft den Verdacht einer Verfälschung. Insgesamt werden bei einem Anteil von 5 % Birnensaft drei Kriterien des Apfelsaftprofils nicht erfüllt, so daß der Saft als verfälscht erkannt und herausgefiltert werden konnte. Bei einem Screening müßte dieser Apfelsaft weiterführenden Untersuchungen unterzogen werden, um den Verdacht zu bestätigen.

4.5.7.4 Untersuchung von Säften unbekannter Zusammensetzung

Nachdem ein Birnensaftanteil von nur 5 % mit Hilfe des Apfelsaftfilters nachgewiesen werden konnte, sollen Säfte unbekannter Zusammensetzung untersucht werden. Dazu wurden Fruchtsaftproben als Blindproben von Kollegen im Labor vorbereitet, deren Zusammensetzung dem Analytiker zunächst nicht bekannt war. Insgesamt wurden 15 Fruchtsäfte untersucht, von einigen sollen die Ergebnisse hier erläutert werden.

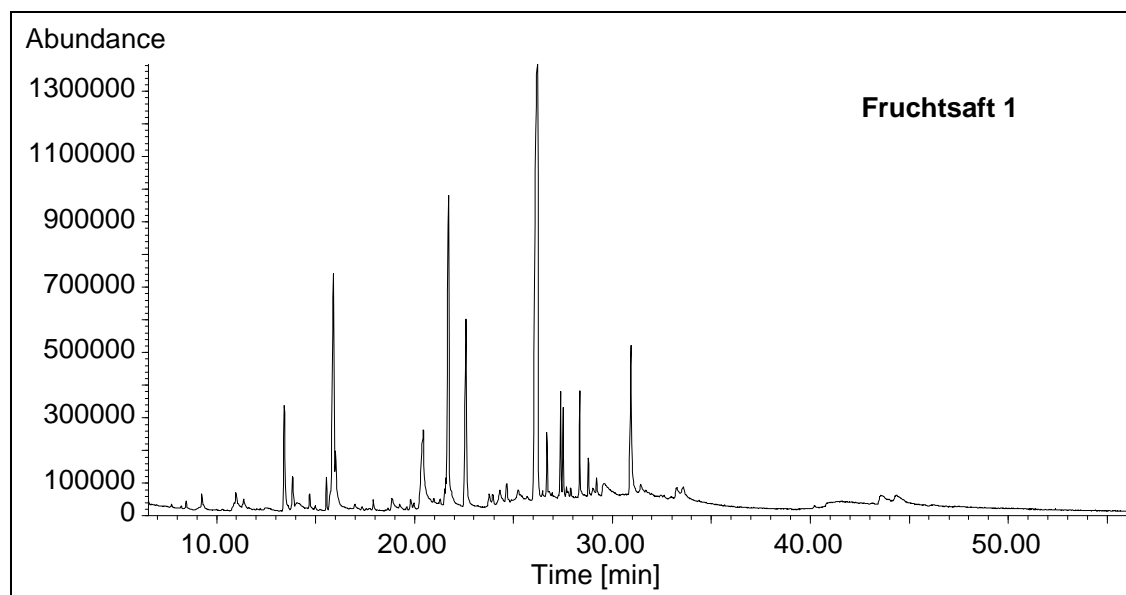
Fruchtsaft 1:

Abb. 4.43: TIC-Chromatogramm des Fruchtsaftes 1, Blindprobe (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

Das in der Abb. 4.43 dargestellte TIC-Chromatogramm entspricht nicht dem für Apfelsaft typischen Muster. Jedoch lassen die für Apfelsaft typischen Matrixpeaks bei $R_t = 33$ min und 44 min einen Apfelsaftanteil vermuten.

Die Ergebnisse des Apfelsaftfilters (Tabelle 4.21) sagen aus, daß es sich bei dem Fruchtsaft nicht um einen Apfelsaft handelt. Der Saft müßte in weitergehenden Untersuchungen analysiert werden, um dieses Ergebnis zu festigen und zu präzisieren.

Die Majorkomponenten erfüllen sieben von neun Kriterien. Die Verhältnisse untereinander stimmen bis auf das Verhältnis von Maleinsäure zu Asparagin (Kriterium 6), verursacht durch den hohen Asparaginanteil, mit dem Apfelsaftprofil überein. Die Majorkomponenten erreichen aber insgesamt nur einen Anteil von 70 %. Die ähnlichen Verhältnisse der Majorkomponenten bestärken die Vermutung, daß in dem untersuchten Fruchtsaft Apfelsaft enthalten ist, dieser aber verfälscht bzw. gemischt wurde.

Die Verhältnisse der Minorkomponenten stimmen nicht mit dem für Apfelsaft ermittelten Profil überein. Der Response von Phenylalanin ist kleiner als der von Prolin (Kriterium 10), Citronensäure hat einen höheren Anteil an den Minorkomponenten als Isocitronensäure (Kriterium 17) und die Werte übersteigen alle die für Apfelsaft festgelegten Höchstwerte. Der sehr hohe Prolinanteil und der ebenfalls hohe Citronensäurewert weisen auf die Verwendung einer Citrusfrucht in der Fruchtsaftmischung hin, jedoch nicht auf eine Zugabe von Citronensäure.

Tabelle 4.21: Anwendung des Apfelsaftfilters auf Fruchtsaft 1 (Blindprobe)

Nr.	Kriterium	Bezug %	Werte	Fruchtsaft 1
1	Major $\geq 94\%$	Gesamt	0,94	X (0,70)
2	Äpfelsre. $\geq 32\%$	Major	0,32	
3	Fumarsre. $>$ Maleinsre.			
4	(Fumarsre.+Maleinsre.) $\geq 33\%$	Major	0,33	
5	Asn $> 2\%$	Major	0,02	
6	Asn \leq Maleinsre.			X
7	Asn $\geq 1,16$		1,16	
8	Asp $< 3\%$	Major	0,03	
9	Asp $<$ Asn			
10	Phe $>$ Pro			X
11	Phe $\leq 15\%$	Minor	0,15	
12	Phe $\leq 0,25$		0,25	X (0,36)
13	Pro $\leq 6\%$	Minor	0,06	X (0,36)
14	Pro $\leq 0,11$		0,11	X (4,56)
15	Val $\leq 0,19$		0,19	X (0,42)
16	Val $\leq 10\%$	Minor	0,10	
17	Citronensre. $<$ Isocitronensre.			X
18	Citronensre. $\leq 7\%$	Minor	0,07	X (0,19)
19	Milchsre. $\leq 25\%$	Minor	0,25	
20	Milchsre. $\leq 0,5$		0,5	
21	Negativkomponenten = 0		0	
Nicht eingehaltene Kriterien			Σ	9 X

Ergebnis:

Die untersuchte Blindprobe enthielt Apfelsaft, der mit dem Saft einer Citrusfrucht gemischt wurde. Beim Screening von Apfelsäften müßte dieser Saft herausgestellt und genauer analysiert werden.

Das Ergebnis wurde im Nachhinein bestätigt, es handelte sich um einen mit Grapefruit-saft gemischten Apfelsaft.

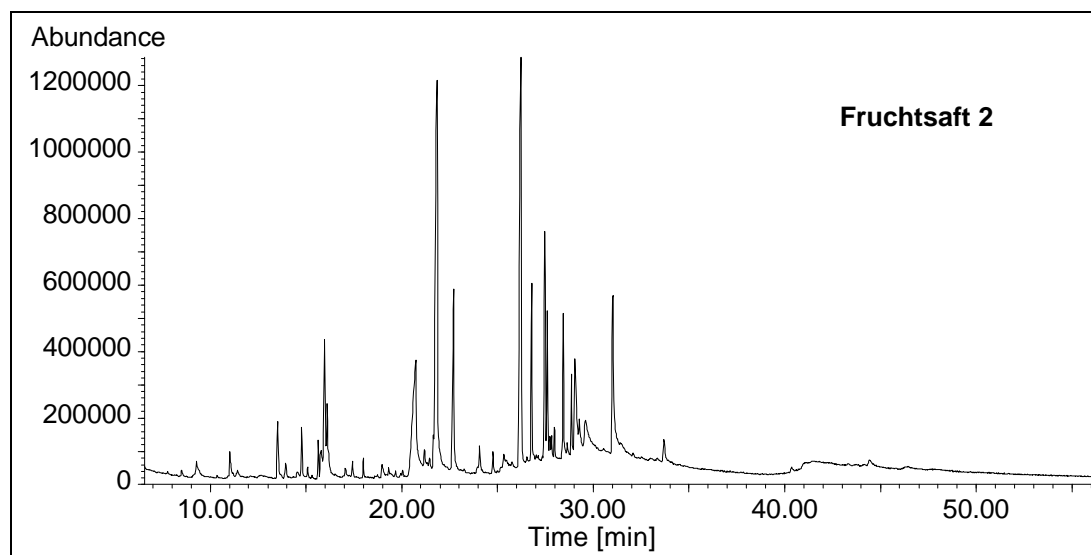
Fruchtsaft 2:

Abb. 4.44: TIC-Chromatogramm des Fruchtsaftes 2, Blindprobe (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

Bei dem in der Abbildung dargestellten Fingerprint handelt es sich nicht um einen Apfelsaft. Beim Vergleich mit den im Kap. 4.4.3 erläuterten Fruchtsäure – Aminosäure – Fingerprints ist die Übereinstimmung mit den Citrusfrüchten am größten (Vgl. auch Anhang F). Die Verwendung von Apfelsaft in einer eventuellen Mischung ist ebenfalls nicht zu erkennen, da weder Fumar- und Maleinsäure noch die für Apfelsaft typischen Matrixpeaks im hinteren Bereich des TIC-Chromatogrammes (bei $R_t = 33$ min und 44 min) zu erkennen sind.

Die in Tabelle 4.22 dargestellten Ergebnisse des Apfelsaftfilters bestätigen die visuelle Auswertung des Fingerprints. Es liegt kein Apfelsaft vor. Die Verhältnisse der Frucht- und Aminosäuren im untersuchten Fruchtsaft stimmen kaum noch mit dem Apfelsaftprofil überein. Die Majorkomponenten erreichen nur 41 % (Kriterium 1) am Gesamtresponse, die Summe von Malein- und Fumarsäure nur einen Anteil von 25 % am Response der Majorkomponenten statt mindestens 33 % (Kriterium 4).

Die absoluten Response-Werte für Prolin und Citronensäure (Kriterien 14, 18) sind viel höher als die in Apfelsaft oder den anderen Kern- und Steinobstfrüchten gemessenen.

Tabelle 4.22: Anwendung des Apfelsaftfilters auf Fruchtsaft 2 (Blindprobe)

Nr.	Kriterium	Bezug %	Werte	Fruchtsaft 2
1	Major $\geq 94\%$	Gesamt	0,94	X (0,41)
2	Äpfelsre. $\geq 32\%$	Major	0,32	
3	Fumarsre. $>$ Maleinsre.			
4	(Fumarsre.+Maleinsre.) $\geq 33\%$	Major	0,33	X (0,25)
5	Asn $> 2\%$	Major	0,02	
6	Asn \leq Maleinsre.			X
7	Asn $\geq 1,16$		1,16	
8	Asp $< 3\%$	Major	0,03	X (0,06)
9	Asp $<$ Asn			
10	Phe $>$ Pro			X
11	Phe $\leq 15\%$	Minor	0,15	
12	Phe $\leq 0,25$		0,25	X (0,49)
13	Pro $\leq 6\%$	Minor	0,06	X (0,29)
14	Pro $\leq 0,11$		0,11	X (6,34)
15	Val $\leq 0,19$		0,19	X (0,75)
16	Val $\leq 10\%$	Minor	0,10	
17	Citronensre. $<$ Isocitronensre.			X
18	Citronensre. $\leq 7\%$	Minor	0,07	X (0,30)
19	Milchsre. $\leq 25\%$	Minor	0,25	
20	Milchsre. $\leq 0,5$		0,5	
21	Negativkomponenten = 0		0	
Nicht eingehaltene Kriterien			Σ	11 X

Ergebnis:

Die untersuchte Blindprobe enthielt keinen Apfelsaft, vermutlich handelt es sich um den Saft einer Citrusfrucht. Beim Screening von Apfelsäften wird dieser Saft herausgefiltert. Das Ergebnis wurde bestätigt, es handelte sich um einen reinen Grapefruitsaft.

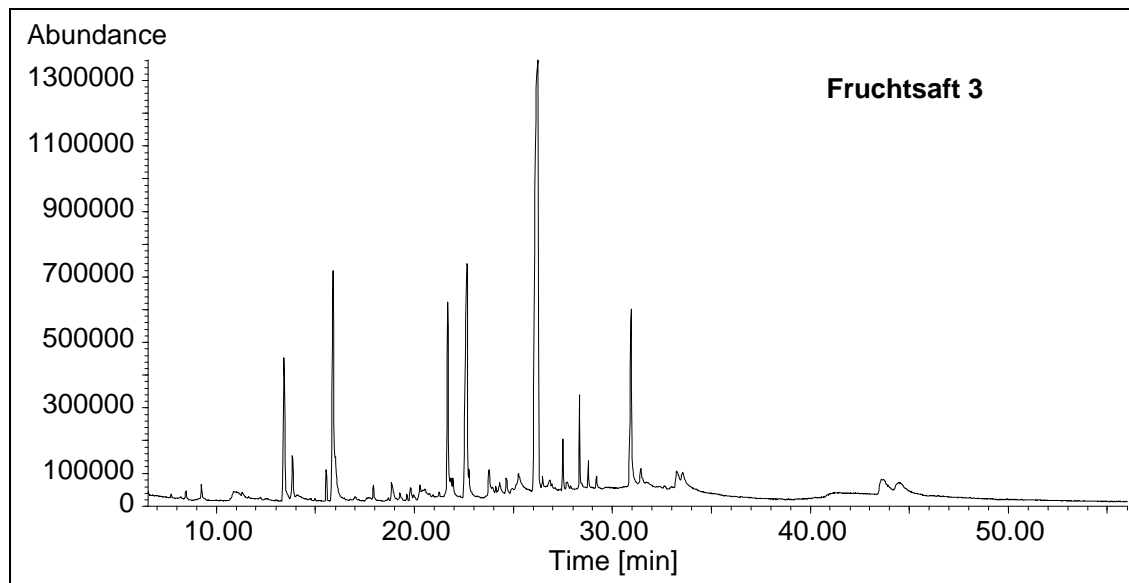
Fruchtsaft 3:

Abb. 4.45: TIC-Chromatogramm des Fruchtsaftes 3, Blindprobe (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

Das in der oberen Abbildung dargestellte TIC-Chromatogramm weist das typische Fruchtsäure – Aminosäure - Muster von Apfelsaft auf, lediglich der hohe Prolinpeak stört den Fingerprint, so daß eine Verfälschung des Apfelsaftes sehr wahrscheinlich ist. Da schon der Anteil der Majorkomponenten (Kriterium 1) nicht dem Apfelsaftprofil entspricht (Tabelle 4.23), ist eine Verfälschung des Apfelsaftes sicher. Die Verhältnisse der Majorkomponenten erfüllen weitestgehend die Kriterien, nur der Asparaginanteil ist zu groß (Kriterium 5).

Bei den Minorkomponenten sind sowohl der Response von Valin (Kriterium 15) als auch von Prolin (Kriterium 14) deutlich erhöht, das Verhältnis von Citronensäure zu Isocitronensäure entspricht jedoch dem Verhältnis, welches für reinen Apfelsaft ermittelt wurde (Kriterium 17). Negativkomponenten konnten nicht nachgewiesen werden.

Aufgrund der Ähnlichkeit des Fingerprints mit dem von Apfelsaft und dem richtigen Verhältnis der Citronensäure zur Isocitronensäure wird eine Verfälschung mit dem Saft einer Citrusfrucht ausgeschlossen.

Tabelle 4.23: Anwendung des Apfelsaftfilters auf Fruchtsaft 3 (Blindprobe)

Nr.	Kriterium	Bezug %	Werte	Fruchtsaft 3
1	Major $\geq 94\%$	Gesamt	0,94	X (0,88)
2	Äpfelsre. $\geq 32\%$	Major	0,32	
3	Fumarsre. $>$ Maleinsre.			
4	(Fumarsre.+Maleinsre.) $\geq 33\%$	Major	0,33	
5	Asn $> 2\%$	Major	0,02	
6	Asn \leq Maleinsre.			X
7	Asn $\geq 1,16$		1,16	
8	Asp $< 3\%$	Major	0,03	
9	Asp $<$ Asn			
10	Phe $>$ Pro			X
11	Phe $\leq 15 \%$	Minor	0,15	
12	Phe $\leq 0,25$		0,25	X (0,29)
13	Pro $\leq 6\%$	Minor	0,06	X (0,32)
14	Pro $\leq 0,11$		0,11	X (1,46)
15	Val $\leq 0,19$		0,19	X (0,63)
16	Val $\leq 10\%$	Minor	0,10	X (0,14)
17	Citronensre. $<$ Isocitronensre.			
18	Citronensre. $\leq 7\%$	Minor	0,07	
19	Milchsre. $\leq 25\%$	Minor	0,25	
20	Milchsre. $\leq 0,5$		0,5	
21	Negativkomponenten = 0		0	
Nicht eingehaltene Kriterien			Σ	8 X

Ergebnis:

Bei dem untersuchten Fruchtsaft handelt es sich um einen verfälschten Apfelsaft. Möglicherweise wurde dem Apfelsaft Birnen- oder Pfirsichsaft zugesetzt. Beim Screening von Apfelsäften wird auch dieser Saft herausgefiltert und genauer analysiert werden müssen.

Das Ergebnis wurde im Nachhinein bestätigt, es handelte sich um einen mit Birnensaft gemischten Apfelsaft.

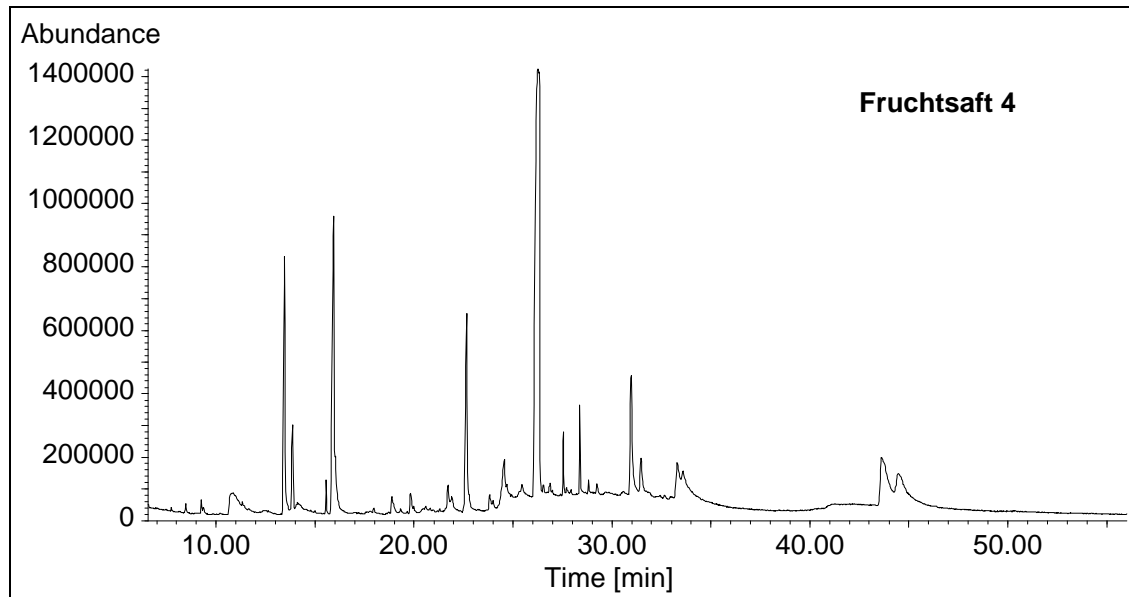
Fruchtsaft 4:

Abb. 4.46: TIC-Chromatogramm des Fruchtsaftes 4 Blindprobe (GC-MS-Bedingungen in Anhang B)

In Abb. 4.46 ist das TIC-Chromatogramm einer weiteren Blindprobe dargestellt. Das aus dem TIC-Chromatogramm hervorgehende Muster der Frucht- und Aminosäuren entspricht dem des Apfelsaftes. Eine mögliche Verfälschung kann aufgrund des Fingerprints nicht festgestellt werden, allerdings fällt auch dieser Saft im Apfelsaftfilter durch. Hier wird lediglich ein Kriterium nicht erfüllt.

Die Ergebnisse der Analyse mit dem Apfelsaftfilter sind in Tabelle 4.24 wiedergegeben.

Tabelle 4.24: Anwendung des Apfelsaftfilters auf Fruchtsaft 4 (Blindprobe)

Nr.	Kriterium	Bezug %	Werte	Fruchtsaft 4
1	Major $\geq 94\%$	Gesamt	0,94	
2	Äpfelsre. $\geq 32\%$	Major	0,32	
3	Fumarsre. $>$ Maleinsre.			
4	(Fumarsre.+Maleinsre.) $\geq 33\%$	Major	0,33	
5	Asn $> 2\%$	Major	0,02	
6	Asn \leq Maleinsre.			
7	Asn $\geq 1,16$		1,16	
8	Asp $< 3\%$	Major	0,03	
9	Asp $<$ Asn			
10	Phe $>$ Pro			
11	Phe $\leq 15\%$	Minor	0,15	
12	Phe $\leq 0,25$		0,25	X (0,33)
13	Pro $\leq 6\%$	Minor	0,06	
14	Pro $\leq 0,11$		0,11	
15	Val $\leq 0,19$		0,19	
16	Val $\leq 10\%$	Minor	0,10	
17	Citronensre. $<$ Isocitronensre.			
18	Citronensre. $\leq 7\%$	Minor	0,07	
19	Milchsre. $\leq 25\%$	Minor	0,25	
20	Milchsre. $\leq 0,5$		0,5	
21	Negativkomponenten = 0		0	
Nicht eingehaltene Kriterien			Σ	1 X

Ergebnis:

Bei dem untersuchten Fruchtsaft handelt es sich um Apfelsaft, dem vermutlich die Aminosäure Phenylalanin zugesetzt wurde. Da aber alle für Apfelsaft typischen Verhältnisse der Frucht- und Aminosäuren eingehalten wurden und nur der absolute Response des Phenylalanins zu hoch ist, kann es sich auch um einen Apfelsaft mit einem sehr hohen natürlichen Phenylalaninanteil handeln. Beim Screening von Apfelsäften müßte dieser Saft daher nochmals überprüft werden.

Es stellte sich heraus, daß es sich tatsächlich um einen Apfelsaft handelte, der laut Herstellerangaben aus 100 % Apfelsaft bestand.

4.5.8 Ergebnis und Diskussion

Durch die Untersuchungen verschiedener Kern- und Steinobstsäfte konnte gezeigt werden, daß der entwickelte Apfelsaftfilter aufgrund der Kriterien des Apfelsaftprofils Bedingungen enthält, die nur von Apfelsaft eingehalten werden. Selbst die dem Apfelsaft ähnlichen Säfte, insbesondere Birnensaft, konnten eindeutig unterschieden werden.

Die Analyse sowohl bekannter als auch unbekannter Mischungen und Verdünnungen zeigte, daß der Apfelsaftfilter erfolgreich bei Verfälschungen mit anderen Säften eingesetzt werden kann. Eine Verfälschung des Apfelsaftes mit nur 5 % Birnensaft wurde erkannt.

Aus den Untersuchungen der Blindproben, die alle richtig beurteilt werden konnten, geht hervor, daß durch die Kombination der visuellen Auswertung unter Einbeziehung typischer Matrixpeaks und der Interpretation der Ergebnisse des Apfelsaftfilters, die Art der Verfälschung eingeschätzt werden kann. Der Apfelsaftfilter gibt dem Analytiker damit nicht nur die Möglichkeit zu erkennen, ob ein Apfelsaft vorliegt oder nicht, sondern auch, ob Citronensäure zugesetzt wurde (Kriterien 17 und 18), mikrobielle Veränderungen vorliegen (Kriterien 19 und 20) oder welche Saftart bei der Verfälschung eventuell verwendet wurde.

Verdünnungen des Saftes bis zu 30 % wurden nicht herausgefiltert, da die typischen Verhältnisse der Frucht- und Aminosäuren durch Wasser nicht verändert werden und aufgrund der zu starken Schwankungen der absoluten Werte in diesem Naturprodukt keine Minimalwerte für Einzelkomponenten festgelegt werden konnten. Nur am Unterschreiten von Minimalwerten, sei es von einzelnen Analyten oder der Summe von mehreren Komponenten, können Verdünnungen sichtbar gemacht werden. Versuche, Kriterien festzulegen, die einen Wasserzusatz nachweisen, blieben bisher ohne Erfolg. Das Erkennen von Verdünnungen mit dem hier entwickelten Apfelsaftfilter, der auf die Verhältnisse der Frucht- und Aminosäuren zueinander ausgerichtet ist, ist noch nicht möglich.

Anhand der Untersuchung eines Fruchtsaftgetränkes mit mindestens 30 % Fruchtgehalt konnte jedoch gezeigt werden, daß der Apfelsaftfilter bei einem so geringen Apfelanteil die typischen Verhältnisse der Frucht- und Aminosäuren noch wahrnehmen kann und der Einsatz bei der Überprüfung von Fruchtsaftgetränken möglich ist. Hier kann wiederum entschieden werden, ob wirklich Apfel verwendet oder noch weitere art-

fremde Früchte zugesetzt wurden. Da nur ein Fruchtsaftgetränk als Beispiel diente, müssen diese Ergebnisse durch zukünftige Untersuchungen bestätigt werden.

4.5.9 Screeningverfahren mit Hilfe des Apfelsaftfilters

Die dargestellten Untersuchungsergebnisse erlauben den Einsatz des Apfelsaftfilters in einem Screeningverfahren.

In einem Untersuchungs- bzw. Überwachungslabor steht der Analytiker vor der Aufgabe viele Fruchtsäfte in kurzer Zeit zu untersuchen und zu beurteilen. Dafür stehen ihm, wie in Kapitel 2.3 vorgestellt, eine Reihe von Verfahren und Methoden zur Verfügung. Sie sind aber in der Regel mit einem recht großen Zeit- bzw. Materialaufwand verbunden, was wiederum Kosten verursacht, die durch den Einsatz eines Screeningverfahrens verringert werden können.

Das Screening von Fruchtsäften mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode und dem entwickelten Apfelsaftfilter ermöglicht bei geringem Aufwand und ebenso geringen Kosten die Beurteilung von Apfelsaft. In Abb. 4.47 ist der mögliche Ablauf eines solchen Screeningverfahrens schematisch dargestellt.

Bei einem sehr geringen Chemikalienverbrauch und Zeitaufwand pro Fruchtsaft können viele Proben in kurzer Zeit derivatisiert werden. Die GC-MS-Analyse benötigt knapp 50 min und kann durch einen automatischen Probengeber noch vereinfacht werden. Andere Arbeiten oder die Auswertung schon gemessener Proben können dann parallel erfolgen.

Die Auswertung der Proben kann mit dem entwickelten Auswerteprogramm und dem Apfelsaftfilter automatisiert durchgeführt werden und benötigt ebenfalls nur wenig Zeit. Nur die Proben, die aus der Fülle der zu untersuchenden Fruchtsäfte Abweichungen aufweisen und durch den Apfelsaftfilter erkannt werden, müssen einer erweiterten Analyse unterzogen werden. Die anderen Proben sind bereits fertig bearbeitet.

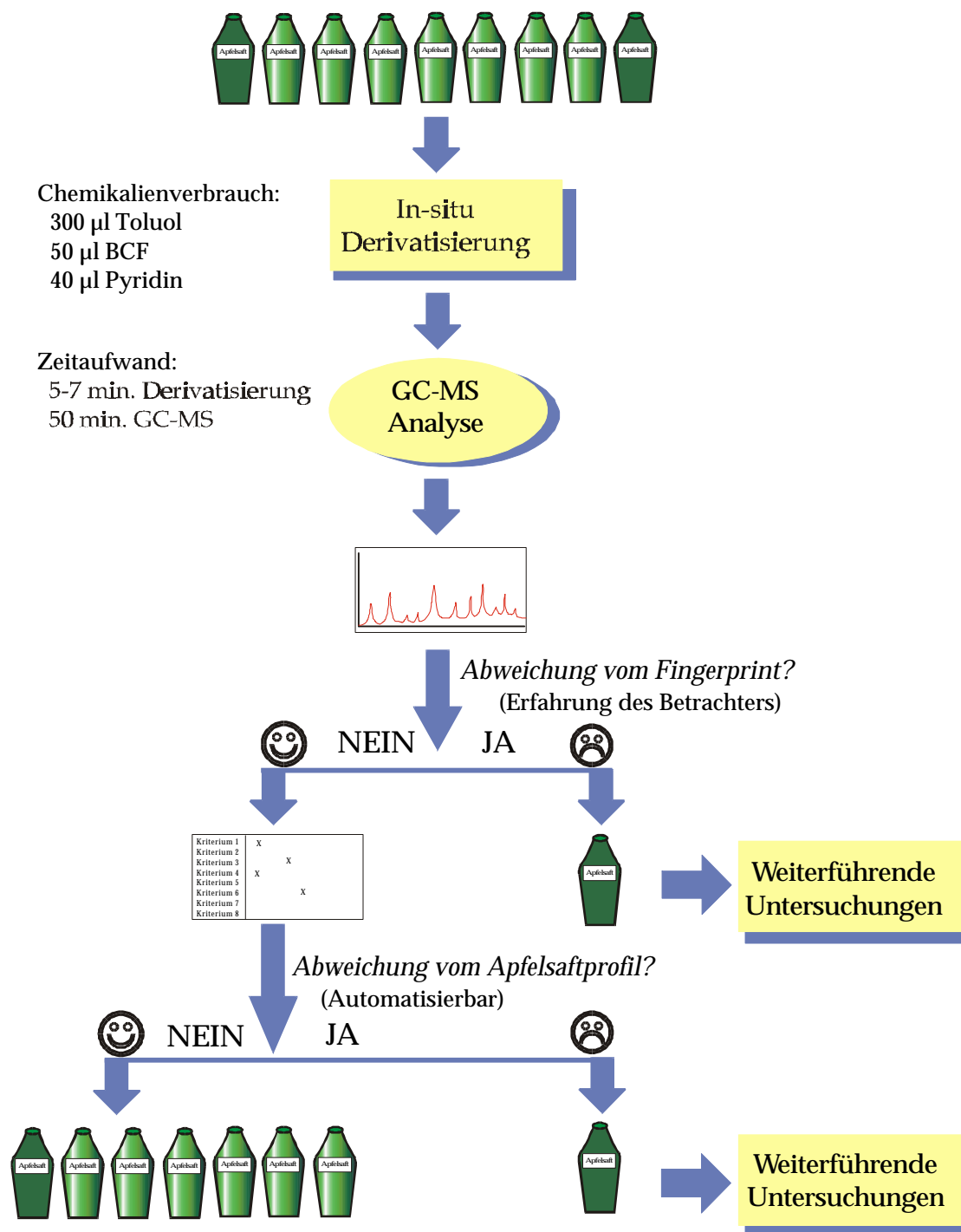


Abb. 4.47: Screeningverfahren mit Hilfe der in-situ Methode und dem daraus entwickelten Apfelsaftfilter

5 Zusammenfassung

Mit dem Ziel ein Screeningverfahren zu erarbeiten, wurde eine neue in-situ Derivatisierung entwickelt, mit deren Hilfe es erstmals möglich ist, 33 verschiedene Frucht- und Aminosäuren in einer einzigen Analyse zu erfassen. Dabei werden verschiedene Substanzklassen, wie Dicarbonsäuren, Hydroxycarbonsäuren, aromatische Säuren und Aminosäuren gleichzeitig bestimmt.

Ohne aufwendige Probenvorbereitung wird der Fruchtsaft dabei im Ultraschallbad mit Butylchloroformat (BCF) versetzt und die funktionellen Gruppen der Säuren in Ester, Carbonate bzw. Carbamate überführt. Durch die anschließende Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC-MS) werden Fingerprints erzeugt, die aufgrund des Substanzspektrums von 33 Frucht- und Aminosäuren für die jeweilige Fruchtart charakteristisch und aussagekräftig sind. Anhand der Untersuchung von 15 verschiedenen Fruchtarten konnte dies verdeutlicht und typische Merkmale der Fingerprints herausgearbeitet werden. So ist es dem geübten Analytiker lediglich durch die visuelle Auswertung der Fingerprints möglich, die Fruchtart zu erkennen und auf grobe Abweichungen hinzuweisen.

Am Beispiel des Apfelsaftes wurde die rein visuelle Auswertung der Fingerprints der 15 verschiedenen Fruchtarten in eine Form transformiert, die eine rechnergestützte Auswertung ermöglicht. Dazu wurde mittels 21 Kriterien ein Apfelsaftprofil erstellt, welches die Grundlage eines „Apfelsaftfilters“ darstellt. Mit Hilfe dieses Apfelsaftfilters ist der Analytiker durch Verknüpfung mit den Daten der GC-MS-Analyse in der Lage, Apfelsaft als solchen und Abweichungen vom Apfelsaftprofil bzw. Verfälschungen zu erkennen. Er erlaubt also reinen, authentischen Apfelsaft über das dem Filter zugrunde liegende Muster zu erkennen.

Durch Testreihen mit anderen authentischen Kern- und Steinobstsäften, die dem Apfelsaft ähnlich sind, mit bekannten Mischungen mit Birnensaft und Wasser und mit Fruchtsaftmischungen in Form von Blindproben wurde der entwickelte Apfelsaftfilter auf die Probe gestellt. Mit diesen Tests konnte gezeigt werden, daß die bei der visuellen Betrachtung ähnlichen Kern- und Steinobstsäfte eindeutig voneinander unterscheidbar sind und die reinen Säfte in keinem Fall verwechselt werden können. Der Apfelsaftfilter hat keinen der anderen Säfte als Apfelsaft erkannt und somit präzise gearbeitet.

Ebenso wurde dargestellt, daß die Kriterien des einfachen Apfelsaftfilters so scharf sind, daß sie z.B. einen Anteil von nur 5 % des sehr ähnlichen Birnensaftes als Verfälschung

erkennen können. Die 15 Blindproben, von denen vier Proben hier diskutiert wurden, konnten alle richtig beurteilt werden. Anhand der Blindproben konnte auch gezeigt werden, daß durch Kombination der visuellen Auswertung der Fingerprints und der Interpretation der Ergebnisse des Apfelsaftfilters Hinweise auf die Art der Verfälschung geben werden können.

Mit Hilfe des in dieser Arbeit vorgestellten Apfelsaftfilters ist der Analytiker in der Lage, trotz natürlicher Schwankungen der Absolutwerte der Einzelverbindungen, zu erkennen, ob ein reiner Apfelsaft oder ein Verdacht auf Verfälschung mit artfremdem Saft vorliegt, der Saft verdorben ist oder Citronensäure zugesetzt wurde.

Das vorgestellte Screeningverfahren, welches auf der neuen in-situ Derivatisierung mit GC-MS und deren Auswertung mit dem Apfelsaftfilter aufbaut, stellt ein Werkzeug für den Analytiker dar, mit dem er in der Routineanalytik in der Lage ist, schnell und ohne großen Aufwand reine Apfelsäfte zu identifizieren und auf verdächtige Proben hinzuweisen, die dann einer weiterführenden Analyse zugeführt werden müssen.

6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde dargestellt, welche Möglichkeiten sich aus der Anwendung der in-situ Derivatisierung in Form des Apfelsaftfilters ergeben.

In den einzelnen Kapiteln wurde schon darauf hingewiesen, welches Potential sowohl in der schnellen und einfachen in-situ Derivatisierung bei der Untersuchung polarer Inhaltsstoffe von Fruchtsäften oder wäßrigen Medien allgemein, als auch in der Entwicklung des daraus resultierenden Fingerprintverfahrens für die Fruchtsaftanalytik stecken.

Bei gegebener analytischer Problemstellung, nur wenige ausgewählte der polaren Frucht- und Aminosäuren zu untersuchen, wird es möglich sein, die Derivatisierungs- und GC-MS-Bedingungen so zu optimieren, daß Nachweis- und Bestimmungsgrenzen weiter gesenkt werden und eine empfindliche quantitative Analysenmethode entsteht.

Im Hinblick auf die visuelle Analyse von Fingerprints und der damit verbundenen Mustererkennung wurde bereits darauf hingewiesen, daß mit selbstlernenden Computerprogrammen ein großes Potential bei der Analytik komplexer Matrizes in Zukunft nutzbar gemacht werden kann.

Der in dieser Arbeit entwickelte einfache Apfelsaftfilter steckt noch in den Kinderschuhen oder ist sozusagen die erste Generation. In Zusammenarbeit mit Informatikern, Geräteherstellern und Fruchtsaftexperten kann dieser Filter weiterentwickelt werden, so daß auch die Art der Verfälschung sicher erkannt oder Verdünnungen nachgewiesen werden können. Diese Möglichkeit wurde z.B. anhand der untersuchten Blindproben deutlich.

In jedem Fall bietet es sich an, durch weitere Analysen und Datensammlungen für andere Früchte Filter zu entwickeln. Es erscheint realistisch, dann unbekannte authentische Säfte zu erkennen, zu beurteilen und falls nachgewiesen, die Art der Verfälschung anzuzeigen.

Die ersten Erfahrungen mit diesem neuen Verfahren lassen erwarten, daß es in Zukunft aufgrund seiner Einfachheit, Schnelligkeit und damit Ökonomie in der Praxis der Fruchtsaftanalytik eine Rolle spielen kann.

7 Literaturverzeichnis

AIJN Code of Practice (1991)

Allgemeine, physikalische, chemische und mikrobiologische Beurteilungskriterien für Frucht- und Gemüsesäfte und –nektare in der EG.

Confructa Studien, 35, 10-36

Andrade, P. B.; Carvalho, A. R. F.; Seabra, R. M.; Ferreira, M. A. (1998)

A Previous Study of Phenolic Profiles of Quince, Pear, and Apple Purees by HPLC Diode Array Detection for the Evaluation of Quince Puree Genuineness.

J. Agric. Food Chem., 46, 968-972

Asmussen, C.; Stan, H.-J. (1998)

Determination of Non-Ionic Surfactants of the Alcohol Polyethoxylate Type by Means of High Temperature Gas Chromatography and Atomic Emission Detection.

J. High Resolut. Chromatogr., 21, 597-604

Asp, T. N.; Pedersen-Bjergaard, Greibrokk, T. (1996)

Calculation of elemental ratios by on-column radiofrequency plasma atomic emission detection coupled with capillary gas chromatography.

J. Chromatogr. A, 736, 157-164

Avdalovic, N.; Pohl, C. A.; Rocklin, R. D.; Stillian, J. R. (1993)

Determination of Cations Combined with Suppressed Conductivity Detection.

Anal. Chem., 65, 1470-1475

Barden, T. J.; Croft, M. Y.; Murby, E. J.; Wells, R. J. (1997)

Gas chromatographic determination of organic acids from fruit juices by combined resin mediated methylation and extraction in supercritical carbon dioxide.

J. Chromatogr. A, 785, 251-261

Beenakker, C. I. M. (1976)

A Cavity for Microwave Induced Plasmas Operated in Helium and Argon Atmospheric Pressure.

Spectrochim. Acta., Part B 32, 173

Bengoechea, M. L.; Sancho, A. I.; Bartolomé, B.; Estrella, I. (1997)

Phenolic Composition of Industrially Manufactured Purées and Concentrates from Peach and Apple Fruits.

J. Agric. Food Chem., 45, 4071-4075

Bielig, H. J.; Hofsommer, H.-J. (1982)

Zur Aussagekraft des Aminosäurespektrums in Apfelsäften.

Flüssiges Obst, 49, 50-56

Binnig, R. (1992)

Helle, farbstabile Apfelsäfte.

Flüssiges Obst, 59, 540-544

Björklund, J.; Einarsson, S.; Engström, A.; Grzegorzczak, A.; Becker, H.-D. (1998)

Automated amino acid determination by high-performance liquid chromatography with 2-(9-anthryl)ethyl chloroformate as precolumn reagent.
J. Chromatogr. A, 798, 1-8

Blau, K., Halket, J. M.

Handbook of derivatives for chromatography.
Wiley, 2. Ed., Chicester, 1993

Boland, F. E. (1991)

Fruits and Fruit Products. Adulteration of Apple Juice.
J. Assoc. Off. Anal. Chem, 74, 143-145

Brause, A. (1992)

Verfahren zum Nachweis von Fruchtsaftverfälschungen – Perspektiven 1991.
Flüssiges Obst, 59, 178-182

Brückner, H.; Langer, M.; Lüpke, M.; Westhauser, T.; Godel, H. (1995)

Liquid chromatographic determination of amino acids enantiomers by derivatization with o-phthaldialdehyde and chiral thiols. Application with reference to food science.
J. Chromatogr. A, 697, 229-245

Budzikiewicz, H.

Massenspektrometrie. Eine Einführung.
VCH Verlagsgesellschaft mbH, 3. Aufl., Weinheim, 1992

Burrows, E. P. (1998)

Dimethyl Ether Chemical Ionization Mass Spectrometry of α -Amino Acids.
J. Mass Spectr., 33, 221-228

Busch, K. L. (1995)

Desorption Ionization Mass Spectrometry.
J. Mass Spectrom., 30, 233-240

Butz, S.; Stan, H.-J. (1993)

Determination of chlorophenoxy and other acidic herbicide residues in ground water by capillary gas chromatography of their alkyl esters formed by rapid derivatization using various chloroformates.
J. Chromatogr., 643, 227-238

Butz, S.

Bestimmung von Pflanzenschutzmittelrückständen in Wasser; Entwicklung einer Multimethode.
Dissertation D83, FB 15, TU Berlin, Wissenschaft und Technik Verlag, 1. Aufl., Berlin, 1994

Carratù, B.; Boniglia, C.; Bellomonte, G. (1995)

Optimization of the determination of amino acids in parenteral solutions by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization using 9-fluorenylmethyl chloroformate.
J. Chromatogr. A, 708, 203-208

Chaytor, J. P. (1986)

The Analysis of Amino Acids in Fruit Juices by High-performance Liquid Chromatography.
J. Sci. Food Agric., 37, 1019-1026

Chen, J.; Preston, B. P.; Zimmenmann, M. (1997)

Analysis of organic acids in industrial samples Comparison of capillary electrophoresis and ion chromatography.
J. Chromatogr. A, 781, 205-213

Colquhoun, I. J. (1998)

Highresolution NMR spectroscopy in food analysis and authentication.
Spectroscopy Europe, 10, 8-18

Cummins, M. T.; Wells, R. J. (1997)

In situ derivatization and extraction of volatile fatty acids entrapped on anion-exchange resin from aqueous solutions and urine as a test matrix using pentafluorobenzyl bromide in supercritical carbon dioxide.
J. Chromatogr. B, 694, 11-19

Dasgupta, P. K.; Bao, L. (1993)

Suppressed Conductometric Capillary Electrophoresis Separation Systems.
Anal. Chem., 65, 1003-1011

D`Avis, W. (1997)

Computer – Gehirn. Ein kritischer Vergleich.
Künstliche Intelligenz, 2/97, 6-12

Dietrich, H., Will, F. (1996)

Bedeutung der Stärke bei der Herstellung von Apfelsaft.
Flüssiges Obst, 63, 582-587

Dyremark, A.; Ericsson, M. (1990)

An LCEC Method for the Analysis of Synthetic Amino Acids in Fruit Juices.
Chromatographia, 29, 51-53

Einarsson, S.; Josefsson, B. (1987)

Separation of Amino Acid Enantiomers and Chiral Amines Using Precolumn Derivatization and Reversed-Phase Liquid Chromatography.
Anal. Chem., 59, 1191-1195

Elkins, E. R.; Heuser, J. R. (1994)

Detection of Adulteration in Apple Juice by L-Malic/Total Malic Acid Ratio: Collaborative Study.
J. AOAC Int., 77, 411-415

Evans, R.H.; Soestbergen, van A. W.; Ristow, K. A. (1983)

Evaluation of Apple Juice Authenticity by Organic Acid Analysis.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 66, 1517-1519

Evans, R (1996)

Juice Authentication.
Soft Drinks Management International, 09/96, 27-28

Feyrer, S.; Zell, A. (1999)

Personentracking mit einer mobilen Roboterplattform unter Verwendung eines multimodalen Detektionsansatzes.
Künstliche Intelligenz, 1/99, 7-12

Field, J. A.; Monohan, K. (1995)

In-Vial Derivatization and Empore Disk Elution for the Quantitative Determination of the Carboxylic Acid Metabolites of Dacthal in Groundwater.
Anal. Chem., 67, 3357-3362

Franke, C.; Weil, L.; Niessner, R. (1995)

Extraction of mono- and dicarboxylic acids from curative water.
Fres. J. Anal. Chem., 353, 203-205

Fruchtsaft-Verordnung (Verordnung über Fruchtsaft, konzentrierten Fruchtsaft und getrockneten Fruchtsaft).

In der Fassung der Bekanntmachung vom 17. Februar 1982. Zuletzt geändert durch Art. 11 VO zur Neuordnung lebensmittelrechtlicher Vorschriften über Zusatzstoffe v. 29. Januar 1998

Fuchs, G., Koswig, S. (1997)

Neue Analytik für neue (alte) Aufgaben.
Flüssiges Obst, 64, 354-358

Fuleki, T.; Pelayo, E.; Palabay, R. B. (1995)

Carboxylic Acid Composition of Varietal Juices Produced from Fresh and Stored Apples.
J. Agric. Food Chem., 43, 598-607

Godel, H.; Seitz, P.; Verhoef, M. (1992)

Automated Amino Acid Analysis Using Combined OPA and FMOC-Cl Precolumn Derivatization.
LC-GC Int., 5, 44-49

Goheen, S. C.; Wahl, K. L.; Campbell, J. A.; Hess, W. P. (1997)

Mass Spectrometry of Low Molecular Mass Solids by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization.
J. Mass Spectrom., 32, 820-828

Gomis, D. B.; Gutiérrez, M. J. M.; Gutiérrez Alvarez, M. D.; Medel, A. S. (1987)

High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Major Organic Acids in Apple Juices and Ciders.
Chromatographia, 24, 347-350

Gomis, D. B.; Gutiérrez, M. J. M.; Gutiérrez Alvarez, M. D.; Alonso, J. J. M. (1988)

Application of HPLC to Characterization and Control of Individual Acids in Apple Extracts and Ciders.
Chromatographia, 25, 1054-1058

Gonzalez, J.; Jamin, E.; Remaud, G.; Martin, Y.-L.; Martin, G. G.; Martin, M. L. (1998)

Authentication of Lemon Juices and Concentrates by a Combined Multi-isotope Approach Using SNIF-NMR and IRMS.
J. Agric. Food Chem., 46, 2200-2205

Gottwald, W.

GC für Anwender.
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1995

Grassin, C. (1992)

Preßenzyme in der apfelverarbeitenden Industrie.
Flüssiges Obst, 59, 418-422

Grob, R. L.

Modern practice of gas chromatography.
Wiley, 2. Ed., New York, 1985

Grosheny, B.; Isengard, H.-D.; Philipp, O. (1995)

Bestimmung von zwölf organischen Säuren und 5-Hydroxymethylfurfural in Fruchtsäften mit HPLC.
Dtsch. Lebensm. Rdsch., 91, 137-140

Günther, W.; Schlegelmilch, F.

GC mit Kapillartrennsäulen. Grundlagen.
Vogel-Buchverlag, Würzburg, 1984

Gurka, D. F.; Pyle, S.; Titus, R. (1997)

Environmental Application of Gas Chromatography/Atomic Emission Detection.
Anal. Chem., 69, 2411-2417

Gustavsson, B.; Betner, I. (1990)

Fully automated amino acid analysis for protein and peptide hydrolysates by precolumn derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate and 1-aminoadamantane.
J. Chromatogr., 507, 67-77

Hahn, R. (1996)

Der Handelsbrauch – ein lebensmittelrechtliches Instrument.
Flüssiges Obst, 63, 402-403

Hamatschek, J.; Pecoroni, S. (1996)

Dekanter und Separatoren zur Herstellung von qualitativ hochwertigen Apfelsäften.
Flüssiges Obst, 63, 120-124

Hammond, D. (1992)

Fruit Juice – Pure as it should be?
Livsmedelsteknik, 34, 35-36

Hartmann, E. (1993)

Ausbeute- und Leistungsvergleich beim Entsaften von Früchten.
Flüssiges Obst, 60, 239-244

Hempel, G. (1998)

Bestimmung von α -Hydroxycarbonsäuren in kosmetischen Mitteln.
Dtsch. Lebensm. Rdsch., 94, 118-119

Herrmann, K. (1993)

Vorkommen, Gehalte und Bedeutung von Inhaltsstoffen des Obst und Gemüses. XII.
Die Säuren der Obstarten.
Ind. Obst- und Gemüseverwert., 78, 58-61

Herrmann, K. (1994)

Nachweis nicht deklarierter Fruchtzusätze in Obsterzeugnissen sowie deren
Unverfälschtheit über die Bestimmung von Flavonoiden.
Ind. Obst- und Gemüseverwert., 79, 443-447

Hesford, F. (1996)

Die neueste Affäre beim Apfelsaft.
Flüssiges Obst, 63, 511-512

Hesford, F. (1997)

Welche Konsequenzen werden aus den Verfälschungen der jüngsten Vergangenheit
gezogen?. Flüssiges Obst, 64, 627-630

Husek, P. (1990)

Fast Esterification of fatty Acids with Alkyl Chloroformates – Optimization and
Applikation in Gas Chromatography -.
J. High Resolut. Chromatogr., 13, 633-638

Husek, P. (1991 a)

Derivatization and gas chromatographic determination of hydroxycarboxylic acids
treated with chloroformates.
J. Chromatogr., 547, 307-314

Husek, P. (1991 b)

Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids.
J. Chromatogr., 552, 289-299

Husek, P. (1992)

Fast Derivatization with Chloroformates for Gas Chromatographic Analysis.
LC-GC Int., 5, 43-49

Husek, P. (1993)

Improved procedure for the derivatization and gas chromatographic determination of
hydroxycarboxylic acids treated with chloroformates.
J. Chromatogr., 630, 429-437

Jamin, E.; Gonzalez, J.; Remaud, G.; Naulet, N.; Martin, G. G. (1997)

Detection of Exogeneous Sugars or Organic Acids Addition in Pineapple Juices and
Concentrates by ¹³C IRMS Analysis.
J. Agric. Food Chem., 45, 3961-3967

Jong, A. P. J. M. de (1983)

Derivatization of Catecholamines in Aqueous Solution for Quantitative Analysis in Biological Fluids.
J. Chromatogr., 276, 267-278

Junge, C.; Spadinger, C. (1982)

Nachweis eines Zusatzes von Äpfelsäure [L(-) und DL] in Apfel- und Birnensäften durch quantitative Bestimmung der Fumarsäure.
Flüssiges Obst, 49, 57-59

Kawamura, K. (1993)

Identification of C₂-C₁₀ ω-Oxocarboxylic Acids, Pyruvic Acid, and C₂-C₃ α-Dicarbonyls in Wet Precipitation and Aerosol Samples by Capillary GC and GC/MS.
Anal. Chem., 65, 3505-3511

Kenney, B. F. (1991)

Determination of organic acids in food samples by capillary electrophoresis.
J. Chromatogr., 546, 423-430

Kirschbaum, J.; Luckas, B.; Beinert, W.-D. (1994)

HPLC-Analyse von Biogenen Aminen und Aminosäuren in Nahrungsmitteln nach automatischer Vorsäulenderivatisierung mit 9-Fluorenylmethyl Chloroformiat (Fmoc-Cl).
Dtsch. Lebensm. Rdsch., 90, 224-227

Koch, J. (Hrsg.)

Getränkebeurteilung. Handbuch der Lebensmitteltechnologie.
Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 1986

Korth, A. (1991)

AIJN-Code of Practice – ein wichtiger Schritt in Richtung Gemeinsamer Binnenmarkt für Fruchtsäfte und Fruchtnektare.
Confructa Studien, 35, 6-9

Krause, I.; Bockhardt, A.; Neckermann, H.; Henle, T.; Klostermeyer, H. (1995)

Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives.
J. Chromatogr. A, 715, 67-79

Kurosu, Y.; Murayama, K.; Shindo, N.; Shisa, Y.; Satou, Y.; Senda, M.; Ishioka, N. (1998)

Optical resolution of phenylthiohydantoin-amino acids and identification of phenylthiohydantoin-D-amino acid residue of [D-Ala²]-methionine enkephalin by capillary electrophoresis.
J. Chromatogr. A, 802, 129-134

Lea, A. G. H. (1984)

Farb- und Gerbstoffe in englischen Mostäpfeln.
Flüssiges Obst, 51, 356-361

Lee, H.; Wrolstad, R. E. (1988)

Apple Juice Composition: Sugar, Nonvolatile Acid, and Phenolic Profiles.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71, 789-794

Liebich, H. M., Först, C. (1990)

Basic Profiles of Organic Acids in Urine.
J. Chromatogr., 525, 1-14

Linkerhägner, M.

Bestimmung von Pflanzenschutzmittelrückständen mittels
Kapillargaschromatographie und Atomemissionsdetektion.
Dissertation D83, FB 15 Nr. 016, TU Berlin, Shaker Vlg., Aachen, 1994

Liu, Y.; Pietrzyk, D. J. (1998)

Separation of weak organic acids and bases by capillary zone electrophoresis in a
sulfonated-polymer wall-modified open tubular fused-silica capillary.
J. Chromatogr. A, 804, 337-348

Lord, B. S.; Stringham, R. W. (1996)

Liquid Chromatographic Determination of Organic Acids Used as Pharmaceutical
Counterions.
Anal. Chem., 68, 1067-1070

Low, N.H. (1996)

Determination of Fruit Juice Authenticity by Capillary Gas Chromatography with
Flame Ionization Detection.
J. AOAC Int., 79, 724-737

Low, N. H. (1997)

Food authenticity analysis by high performance anion exchange chromatography
with pulsed amperometric detection.
Seminars in Food Analysis, 2, 55-70

Maier, G. (1994)

Innovation bei der Herstellung ultrafiltrierter Säfte und Konzentrate.
Flüssiges Obst, 61, 339-341

Mangas, J. J.; Suárez, B.; Picinelli, A.; Moreno, J.; Blanco, D. (1997)

Differentiation by Phenolic Profile of Apple Juices Prepared According to Two
Membrane Techniques.
J. Agric. Food Chem., 45, 4777-4784

Mangas, J. J.; Moreno, J.; Picinelli, A.; Blanco, D. (1998)

Characterization of Cider Apple Fruits According to their Degree of Ripening. A
Chemometric Approach.
J. Agric. Food Chem., 46, 4174-4178

McLafferty, F. W.; Turecek, F.

Interpretation von Massenspektren.
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 1995

Minero, C.; Vincenti, M.; Lago, S.; Pelizzetti, E. (1994)

Determination of trace amounts of highly hydrophilic compounds in water by direct derivatization and gas chromatography – mass spectrometry.
Fres. J. Anal. Chem., 350, 403-409

Nagy, S.; Attaway, J. A.; Rhodes, M. E.

Adulteration of fruit juice beverages.
Marcel dekker, INC. New York, 1988

Neitzel, P. L.; Walther, W.; Nestler, W. (1998)

In-situ methylation of strongly polar organic acids in natural waters supported by ion-pairing agents for headspace GC-MSD analysis.
Fres. J. Anal. Chem., 361, 318-323

Ooghe, W. (1984)

Anmerkungen zu den holländischen Authentizitätskriterien für industriell hergestellte Apfelsäfte.
Flüssiges Obst, 51, 29-31

Pan, M.; Marby, T. J.; Cao, P.; Moini, M. (1997)

Identification of nonprotein amino acids from cycad seeds as N-ethoxycarbonyl ethyl ester derivatives by positive chemical-ionization gas chromatography-mass spectrometry.
J. Chromatogr. A, 787, 288-294

Peldszus, S.; Huck, P. M.; Andrews, S. A. (1998)

Quantitative determination of oxalate and other organic acids in drinking water at low µg/l concentrations.
J. Chromatogr. A, 793, 198-203

Pedersen-Bjergaarden, S.; Asp, T. N.; Greibrokk, T. (1992a)

Factors Affecting C:H and C:N Ratios Determined by Gas Chromatography Coupled with Atomic Emission Detection.
J. High Resolut. Chromatogr., 15, 89-92

Pedersen-Bjergaarden, S.; Asp, T. N.; Vedde, J.; Greibrokk, T. (1992b)

Molecular Formula Determination of Halogenated Compounds in Environmental Samples Using Gas Chromatography and Atomic Emission Detection.
J. Microcol. Sep., 4, 163-170

Pérez, A. G.; Olías, R.; Espada, J.; Olías, J. M.; Sanz, C. (1997)

Rapid Determination of Sugars, Nonvolatile Acids, and Ascorbic Acid in Strawberry and Other Fruits.
J. Agric. Food Chem., 45, 3545-3549

Pietsch, J.; Hampel, S.; Schmidt, W.; Brauch, H.-J.; Worch, E. (1996)

Determination of aliphatic and alicyclic amines in water by gas and liquid chromatography after derivatization by chloroformates.
Fres. J. Anal. Chem., 355, 164-173

Pilando, L. S.; Wrolstad, R. E. (1992)

Compositional profiles of fruit juice concentrates and sweeteners.
Food Chemistry, 44, 19-27

Pinkston, D.; Spiteller, G.; von Henning, H.; Matthaei, D. (1981)

High-Resolution Gas Chromatography-Mass Spectrometry of the Methyl Esters of Organic Acids from Uremic Hemofiltrates.
J. Chromatogr. B, 223, 1-19

Rapisarda, P.; Carollo, G.; Fallico, B.; Tomaselli, F.; Maccarone, E. (1998)

Hydroxycinnamic Acids as Markers of Italian Blood Orange Juices.
J. Agric. Food Chem., 46, 464-470

RSK-Werte. Die Gesamtdarstellung.

Verband der Deutschen Fruchtsaft-Industrie (Hrsg.)
Richtwerte und Schwankungsbreiten bestimmter Kennzahlen mit überarbeiteten Analysenmethoden. Verlag Flüssiges Obst, Schönborn, 1987

Scalia, S.; Callegari, R.; Villani, S. (1998)

Determination of glycolic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr. A, 795, 219-225

Schauwecker, P. (1994)

Nanofiltration von Apfelsaft.
Flüssiges Obst, 61, 269-270

Schlenk, H., Gellermann, J. L. (1960)

Esterification of fatty acids with diazomethane on a small scale.
Anal. Chem., 32, 1412-1414

Schmid, E. R. (1990)

Chromatography and Mass Spectrometry – An Overview.
Chromatographia, 30, 573-576

Schobinger, U.

Frucht- und Gemüsesäfte. Handbuch der Lebensmitteltechnologie.
Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 1987

Schobinger, U., Barbic, I., Dürr, P., Waldvogel, R. (1996)

Polyphenole in Apfelsaft – positive und negative Wirkungen.
Flüssiges Obst, 63, 267-271

Schomburg, G.

Gaschromatographie. Grundlagen, Praxis, Kapillartechnik.
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1987

Schulten, H. R.; Sorge, C. (1995)

Pyrolysis methylation-mass spectrometry of whole soils.
European Journal of Soil Science, 46, 567-579

Schumann, G.

Alkoholfreie Getränke. Rohstoffe Produktion Lebensmittelrechtliche Bestimmungen.
Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei, Westkreuz-Druckerei Ahrens KG, Berlin,
1994

Sennewald, K. (1995)

Ausgewählte Rechtsfragen.
Flüssiges Obst, 62, 267-271

Shahrzad, S.; Bitsch, I. (1996)

Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr. A, 741, 223-231

Sharma, A. K.; Clauss, S. A.; Mong, G. M.; Wahl, K. L.; Campbell, J. A. (1998)

Analysis and quantification of organic acids in simulated Hanford tank waste and Hanford tank waste.
J. Chromatogr. A, 805, 101-107

Sontag, G.; Bernwieser, I. (1994)

HPLC Coupled With a Coulometric Elektrode Array Detector - Determination of phloretin glycoside in juice for detection of adulteration.
Dtsch. Lebensm. Rdsch., 90, 72-75

Spiteller, M.; Spiteller, G. (1979)

Trennung und Charakterisierung saurer Harnbestandteile.
J. Chromatogr., 164, 253-317

Spröer, P.-D. (1985)

Über die Bedeutung der freien Aminosäuren in Apfelsaft für die Beurteilung von Identität und Reinheit.
Flüssiges Obst, 53, 18-28

Stutz, C. (1996)

Enzymatische Verflüssigung: Vision oder Tatsache?
Flüssiges Obst, 63, 371-373

Suárez, B.; Picinelli, A.; Moreno, J.; Mangas, J. J. (1998)

Changes in Phenolic Composition of Apple Juices by HPLC with Direct Injection.
J. Sci. Food Agric., 78, 461-465

Sullivan, J. J.; Quimby, B. D. (1989)

Detection of C, H, N, and O in Capillary Gas Chromatography by Atomic Emission.
J. High Resolut. Chromatogr., 12, 283-286

Taga, A.; Sugimura, M.; Honda, S. (1998)

Derivatization of amino acids in a moving zone of *o*-phthalaldehyde in the middle of a capillary for amino acid analysis by capillary electrophoresis.
J. Chromatogr. A, 802, 243-248

Uden, P. C. (1995)

Element-specific chromatographic detection by atomic absorption, plasma atomic emission and plasma mass spectrometry.
J. Chromatogr. A, 703, 393-416

Vatankhah, M.; Moini, M. (1994)

Characterization of Fluorinated Ethylchloroformate Derivatives of Protein Amino Acids Using Positive and Negative Chemical Ionization Gas Chromatography/Mass Spectrometry.
Biological Mass Spectrometry, 23, 277-282

VdF-Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e.V. (Hrsg.). (1998)

Apfelsaft in aller Munde.
pr bonn Public Relations GmbH, Bonn

Vincenti, M.; Minero, C.; Lago, S. (1995)

Determination of Hydroxycarbamates in Aqueous Matrices by Direct Derivatization and GC-MS Analysis in Chemical Ionization Mode.
J. High Resolut. Chromatogr., 18, 359-362

Voet, D.; Voet, J. G.

Biochemie.
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1994

Wade, R. L. (1992)

USA: Neue Analysenverfahren zum Nachweis von Fruchtsaftverfälschung.
Flüssiges Obst, 59, 275-288

Wallrauch, S. (1985)

Aminosäuren als Kriterium für die Beurteilung von Fruchtsäften.
Flüssiges Obst, 52, 371-375

Webster, C.; Cooke, M. (1995)

Use of Atomic Emission Detector to Study the Variation in Elemental Response for Chlorine, Carbon, and Oxygen in Phenols.
J. High Resol. Chromatogr., 18, 319-322

Weinand, R. (1994)

Einsatz von Adsorberharzen in der Fruchtsaftindustrie.
Flüssiges Obst, 61, 472-475

Weiss, J.; Reinhard, S. (1995)

Aliphatische Carbonsäuren – Ein schwieriges chromatographisches Problem?
GIT Spezial, Chromatographie 2/95, 105-114

Will, F.; Dietrich, H. (1992)

Einfluß der Maischeenzymierung auf den Restpektingehalt klarer Apfelsäfte, Auswirkungen auf den Alkoholtest.
Flüssiges Obst, 59, 530-536

Woo, K.-L.; Ahan, Y.-K. (1996)

Determination of protein amino acids as benzylthiocarbamyl derivatives compared with phenylthiocarbamyl derivatives by reversed-phase high-performance liquid chromatography, ultraviolet detection and precolumn derivatization.

J. Chromatogr. A, 740, 41-50

Woo, K.-L.; Hwang, Q.-C.; Kim, H.-S. (1996)

Determination of amino acids in the food by reversed-phase high-performance liquid chromatography with a new precolumn derivative, butylthiocarbamyl amino acid, compared to the conventional phenylthiocarbamyl derivatives and ion-exchange chromatography.

J. Chromatogr. A, 740, 31-40

Wu, Z.; Tong, W. G. (1998)

Absorbance detection of amino acids by laser wave mixing in microbore liquid chromatography.

J. Chromatogr. A, 805, 63-69

Wucherpennig, K.; Hahn, P.; Semmler, G.

Handbuch Alkoholfreie Getränke Technologie Recht Physiologie.

Behr's Verlag GmbH & Co., Hamburg, 1990

Wylie, P. L.; Sullivan, J. J.; Quimby, B. D. (1990)

An investigation of Gas Chromatography with Atomic Detection for the Determination of Empirical Formulas.

J. High Resolut. Chromatogr., 13, 499-506

Yieru, H.; Quigyu, O.; Weile, Y. (1990)

The Effect of Compound Structure on the Elemental Response in Gas Chromatography-Microwave Induced Plasma Atomic Emission Spectrometry.

J. Chromatogr. Sci., 28, 584-588

Yokoyama, Y.; Ozaki, O.; Sato, H. (1996)

Separation and Determination of amino acids, creatinine, bioactive amines and nucleic acid bases by dual-mode gradient ion-pair chromatography.

J. Chromatogr. A, 739, 333-342

Zapf, A. (1998)

Identifizierung und Bestimmung von Metaboliten des anaeroben mikrobiellen Abbaus von chlorierten Benzolen.

Dissertation D83, FB 15 Nr.121, TU Berlin

Zumwalt, R. W.; Desgres, J.; Kuo, K. C.; Pautz, J. E.; Gehrke, C. W. (1987)

Amino Acid Analysis by Capillary Gas Chromatography.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70, 253-262

Zusatzstoffzulassungsverordnung (Zusatzstoff-Verkehrsverordnung)

Verordnung zur Neuordnung lebensmittelrechtlicher Vorschriften über Zusatzstoffe.

Zuletzt geändert am 29. Januar 1998 (BGBl. I S. 230, 269)

8 Anhang

Anhang A	Geräte und Chemikalien
Anhang B	Gerätekonfigurationen und Systemparameter
Anhang C	Arbeitsvorschriften
Anhang D	Methode zur automatischen Auswertung der TIC Chromatogramme für Frucht- und Aminosäuren
Anhang E	Massenspektren der Butylderivate
Anhang F	Fingerprints verschiedener Fruchtsäfte
Anhang G	Probennachweis

Anhang A: Geräte und Chemikalien

1. Geräte

Derivatisierungsverfahren	
Reaktionsgefäß	1,5 ml GC Vial, WGA Bördekappen, Chromatographie Service GmbH
Dosieren der Proben und Lösungsmittel	200 µl Mikroeinsätze; WGA 200 - 1000 µl Kolbenhubpipette, Roth
Dosierung der Reagentien	Pipettenspitzen, Eppendorf 100 µl Transferpettor, Brand
Ultraschall	100 µl Präzisionskapillaren, Brand BRANSONIC 12

GC-MS/AED-Analyse	
Gaschromatograph	HP 5890 A series II
Probengeber	HP 7673 A
Kaltaufgabesystem	KAS 3, Gerstel (Mühlheim/Ruhr)
Massenspektrometer	HP 5958 A, MS Engine
Atomemissionsspektrometer	HP 5921 A

2. Chemikalien

Lösungsmittel	Bezug
Toluol	PESTANAL [®] , Riedel-de-Haën AG, Seelzen
Hexan	PESTANAL [®] , Riedel-de-Haën AG, Seelzen
Ethylacetat	PESTANAL [®] , Riedel-de-Haën AG, Seelzen

Analyten	Bezug
Fumarsäure, Maleinsäure, > 99 %	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Salicylsäure, p.A.	Fluka, Buchs (Schweiz)
Citronen-, D,L-Äpfelsäure, > 99,5 %	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

Anhang A: Geräte und Chemikalien

Analyten	Bezug
Glycolsäure, > 95 %	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Milchsäure, Isocitronensäure, > 90 %	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
L-Weinsäure, Malonsäure, p.A.	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Bernsteinsäure, z.A.	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Stearinsäure, > 90 %	Fluka, Buchs (Schweiz)
Sorbinsäure, >98 %	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Benzoessäure, 99 %	Sigma Aldrich, Steinheim
Histidin, >99 %	Fluka, Buchs (Schweiz)
Aminosäuren, p.A.	SERVA, Heidelberg
Chlorphenylalanin, >99 %	Fluka, Buchs (Schweiz)
Chlorbernsteinsäure, 97 %	Sigma Aldrich (Schweiz)

sonstige Chemikalien	Bezug
Pyridin, 99,9 %, HPLC-Grad	Sigma Aldrich, Steinheim
Butylchloroformat, >98 %	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Bernstein-, Maleinsäuredibutylester, Stearin- säure-, Benzoessäurebutylester	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

Anhang B: Gerätekonfigurationen und Systemparameter

1. GC-MSD

Gerätekonfigurationen und Systemparameter	
Chromatographie	
Gaschromatograph	HP 5890 A series II
Kapillarsäule	25 m x 0,32 mm, OV 17 Filmdicke 0,25 µm
Retention gap	5 m x 0,32 mm, unbelegt, deaktiviert mit Phenylsilicon-phase
Trägergas	Helium 4,6
Trägergasfluß	2,5 ml / min
GC-Temperaturprogramm	1 min 90 °C, 5 °C / min auf 200 °C für 2 min, 10 °C / min auf 240 °C für 10 min, 10 °C / min auf 260 °C für 15 min.
Probengeber	HP 7673 A
Kaltaufgabesystem	KAS 3, Gerstel (Mühlheim/Ruhr)
Injektion	150 °C 12 °C / s auf 240 °C für 1 min 12 °C / s auf 300 °C für 5 min splitless: 1,8 min Volumen: 2,5 µl
Detektion	
Massenspektrometer	HP 5958 A, MS Engine
Ionisation	EI
Spannung	70 eV
Quellentemperatur	200 °C
Quadrupoltemperatur	100 °C
Modus	Full scan
Massenbereich	50 - 500 m/z

Anhang B: Gerätekonfigurationen und Systemparameter

2. GC-AED

Gerätekonfigurationen und Systemparameter	
Chromatographie	
Gaschromatograph	HP 5890 A series II
Kapillarsäule	15 m x 0,32 mm, HT-DB 5 Filmdicke 0,1 µm
Retention gap	5 m x 0,32 mm, unbelegt, deaktiviert mit Phenylsilicon- phase
Trärgas	Helium 4,6
GC-Temperaturprogramm	1 min 70 °C, 10 °C / min auf 150 °C für 2 min, 3 °C / min auf 205 °C für 0 min, 10 °C / min auf 250 °C für 15 min.
Probengeber	HP 7673 A
Kaltaufgabesystem	KAS 3, Gerstel (Mühlheim/Ruhr)
Injektion	150 °C 12 °C / s auf 240 °C für 1 min 12 °C / s auf 300 °C für 5 min splitless: 1,8 min Volumen: 2,5 µl
Detektion	
Atomemissionsspektrometer	HP 5921 A
Transferlinientemperatur	240 °C
Spektrometer Purge Flow	2 l N ₂ / min
Window Purge Flow	30 ml He / min
Make-up-Gas	30 ml He / min
Reaktandgas H ₂	30 psi Vordruck
Reaktandgas O ₂	20 psi Vordruck
Cavity- Temperatur	300 °C
Kühlwassertemperatur	63 °C

Anhang C: Arbeitsvorschriften

In-situ Derivatisierung mit Hexylchloroformat

300 µL der wäßrigen Probelösung werden in ein 1 mL Probenfläschchen (GC-vial) pipettiert und mit 30 µL Pyridin versetzt.

Das Probenfläschchen wird so ins Ultraschallbad gehalten, daß eine gute Durchmischung gewährleistet ist. Jetzt werden 45 µL Hexylchloroformat mit einem 100 µL Transferpettor langsam zugetropft. Da die Reaktion nach kurzer Verzögerung sehr heftig ablaufen kann, ist das langsame Zutropfen äußerst wichtig. Nach Abklingen der Reaktion, die an der Bildung von Gasblasen erkennbar ist, wird das Probenfläschchen aus dem Ultraschallbad entfernt und 300 µL Hexan zur Extraktion zupipettiert. Nach der Extraktion ebenfalls im Ultraschallbad wird die organische Phase mit einer Pipette abgehoben und in ein sauberes GC-vial überführt.

In-situ Derivatisierung mit Butylchloroformat

300 µL der wäßrigen Probelösung oder des unverdünnten Fruchtsaftes werden in ein 1 mL Probenfläschchen (GC-vial) pipettiert und mit 40 µL Pyridin als Katalysator versetzt.

Das Probenfläschchen wird so ins Ultraschallbad gehalten, daß eine gute Durchmischung gewährleistet ist. Jetzt werden 50 µL Butylchloroformat mit einem 100 µL Transferpettor langsam zugetropft. Da die Reaktion z.T. sehr heftig abläuft, ist das langsame Zutropfen äußerst wichtig, um Verluste durch Übersäumen zu verhindern. Nach dem Abklingen der Reaktion, die an der Bildung von Gasblasen erkennbar ist, wird das Probenfläschchen aus dem Ultraschallbad entfernt und mit 300 µL Toluol zur Extraktion versetzt. Nach der Extraktion durch kräftiges Schütteln oder mittels *Vortex* wird die organische Phase, die die Derivatisierungsprodukte enthält, mit einer Pipette abgehoben und in ein sauberes GC-vial überführt.

Überprüfen der Derivatisierung am AED

Die Beurteilung der Umsatzrate bei der Derivatisierung durch Bestimmung des Elementresponse der Kohlenstoffspur bei 193 nm am AED durchgeführt. Die Kalibrierung des AED erfolgte mit Hilfe der kommerziell erhältlichen Butylester von Bernsteinsäure, Maleinsäure und Benzoesäure in den Konzentrationen 1, 5, 10 und

50 mg/L. Es wurden jeweils drei Messungen pro Konzentration am GC-AED aufgenommen (Bedingungen s. Anhang B).

Für die Beurteilung der Umsatzrate wurde eine Mischung aus folgenden Frucht- und Aminosäuren in zwei verschiedenen Konzentrationen nach der oben beschriebenen Derivatisierungsvorschrift umgesetzt:

Name der Verbindung	Retentionszeit [min]	Konzentrationen [mg/L]
Malonsäure	4,94	5 / 10
Glycolsäure	5,86	50 / 100
Milchsäure	5,95	50 / 100
Bernsteinsäure	6,17	5 / 10
Glycin	7,47	5 / 10
Alanin	8,19	5 / 10
Isoleucin	9,26	5 / 10
Prolin	9,40	5 / 10
Methionin	13,36	5 / 10
Äpfelsäure	13,56	5 / 10
Phenylalanin	15,77	5 / 10
Weinsäure	24,90	50 / 100
Tryptophan	30,14	5 / 10
Lysin	33,25	5 / 10

Je Konzentration wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Anhang D: Methode zur automatischen Auswertung der TIC-Chromatogramme für Frucht- und Aminosäuren

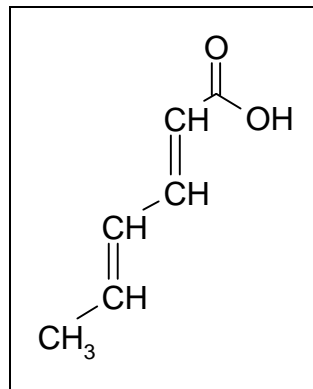
Verbindung	Rt [min]	Target-Ion	Qualifier-Ions
Benzoessäure	9,93	105	123, 77
Malonsäure	11,03	105	87, 143, 161
Salicylsäure	11,88	120	138, 194, 121
Fumarsäure	13,45	117	155, 173, 99
Milchsäure	13,54	135	117, 191
Glycolsäure	13,56	121	103, 76
Bernsteinsäure	13,65	101	157, 89
Maleinsäure	13,85	99	117, 100, 155
Chlorbernsteinsäure	15,59	135	108, 153, 191
Glycin	16,97	130	102, 74, 101
Valin	17,97	172	116, 72
Alanin	18,91	143	144, 116, 88
Leucin	19,31	186	86, 130
Isoleucin	19,66	186	130, 74, 86
Threonin	21,26	101	74, 157, 119
γ -Aminobuttersäure	21,59	144	158, 112, 130
Prolin	21,73	170	70, 114, 271
Asparagin	22,53	69	169, 113
Isocitronensäure	25,23	129	85, 101, 157
Äpfelsäure	26,22	161	89, 217, 145
Methionin	26,47	231	101, 305, 157
Citronensäure	26,78	112	157, 139, 213
Asparaginsäure	27,56	244	144, 88, 186
Phenylalanin	28,38	148	204, 120, 220
Serin	28,83	142	104, 86
Glutaminsäure	29,26	258	84, 184, 156
Chlorphenylalanin	30,99	182	238, 125, 74

Anhang D: Methode zur automatischen Auswertung der TIC-Chromatogramme für Frucht- und Aminosäuren

Verbindung	Rt [min]	Target-Ion	Qualifier-Ions
Glutamin	32,33	84	201, 127, 144
Weinsäure	35,50	177	149, 119
Lysin	40,90	184	128, 84, 198
Histidin	43,14	81	136, 236
Tyrosin	46,38	107	220, 164, 320
Tryptophan	48,73	130	360, 286, 131

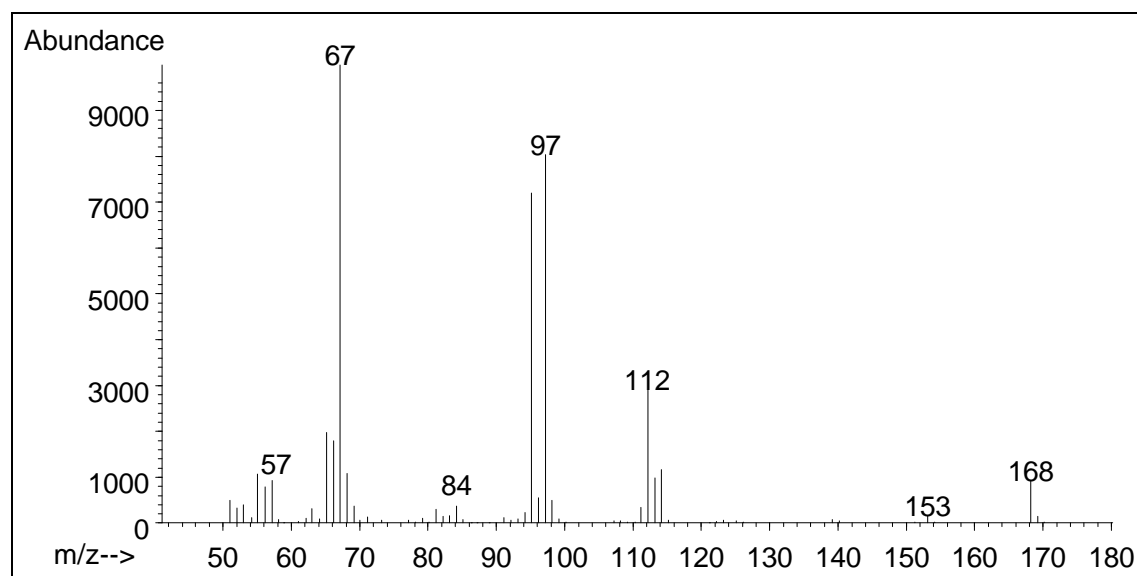
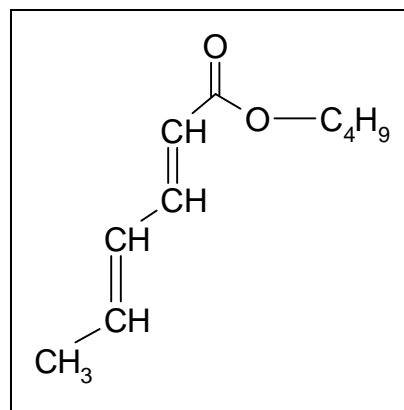
Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate**Sorbinsäure**

Molare Masse: 112 g/mol

Summenformel: $C_6H_8O_2$ **Sorbinsäurederivat**

Retentionszeit: 8,18 min

Molare Masse: 168 g/mol

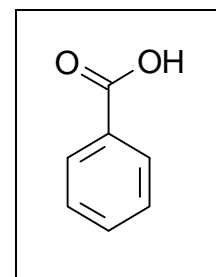
Summenformel: $C_{10}H_{16}O_2$ 

Anhang E: Massenspektren der Butylderivate

Benzoessäure

Molare Masse: 122 g/mol

Summenformel: $C_7H_6O_2$

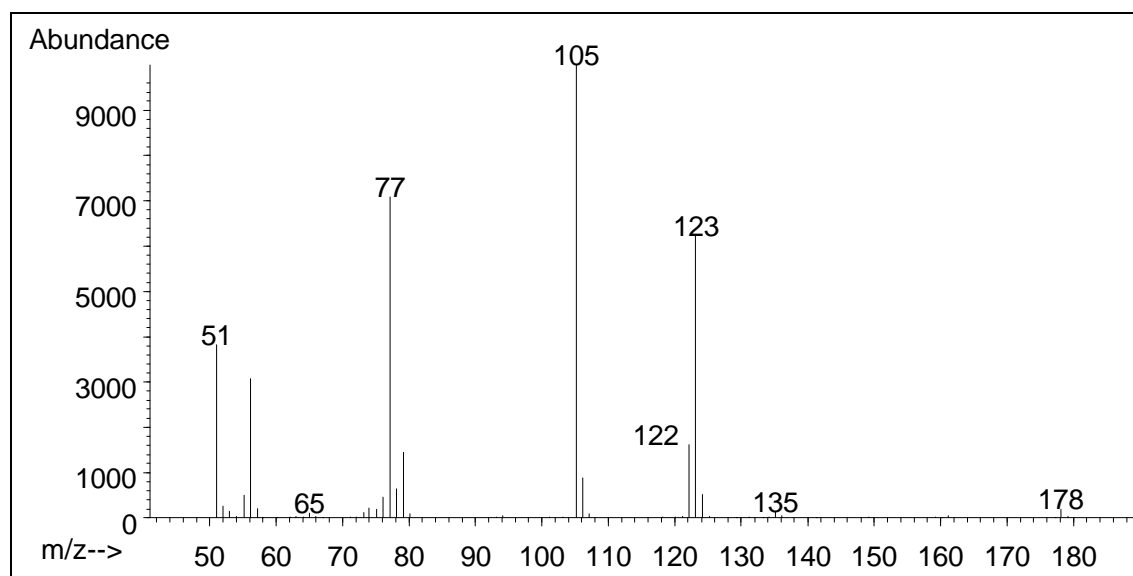
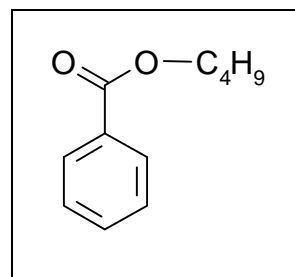


Benzoessäurederivat

Retentionszeit: 9,93 min

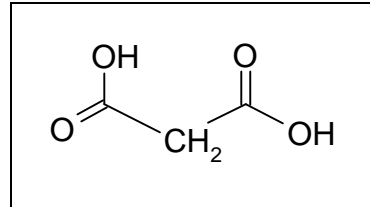
Molare Masse: 178 g/mol

Summenformel: $C_{11}H_{14}O_2$



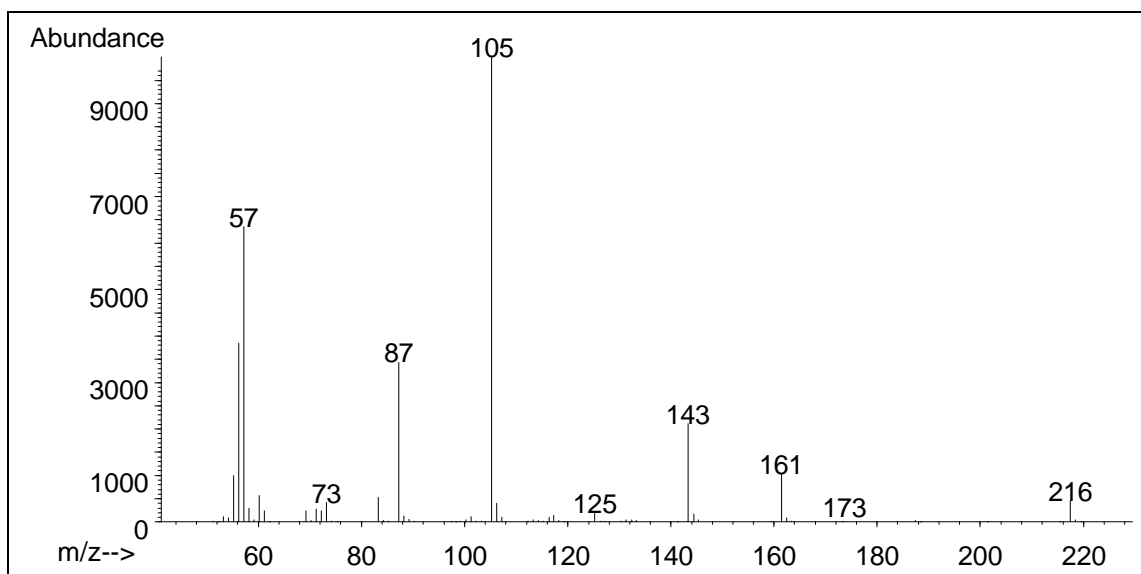
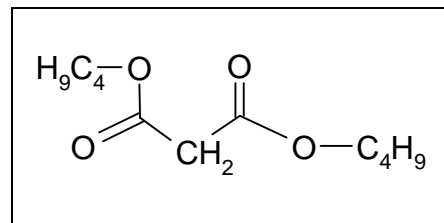
Anhang E: Massenspektren der Butylderivate**Malonsäure**

Molare Masse: 105 g/mol

Summenformel: $C_3H_4O_4$ **Malonsäurederivat**

Retentionszeit: 11,03 min

Molare Masse: 216 g/mol

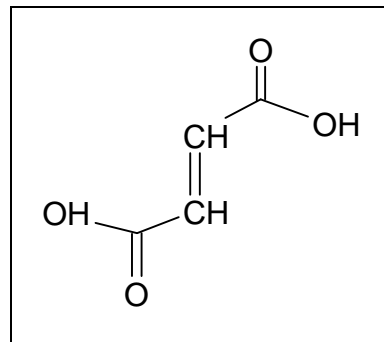
Summenformel: $C_{11}H_{20}O_4$ 

Anhang E: Massenspektren der Butylderivate

Fumarsäure

Molare Masse: 116 g/mol

Summenformel: $C_4H_4O_4$

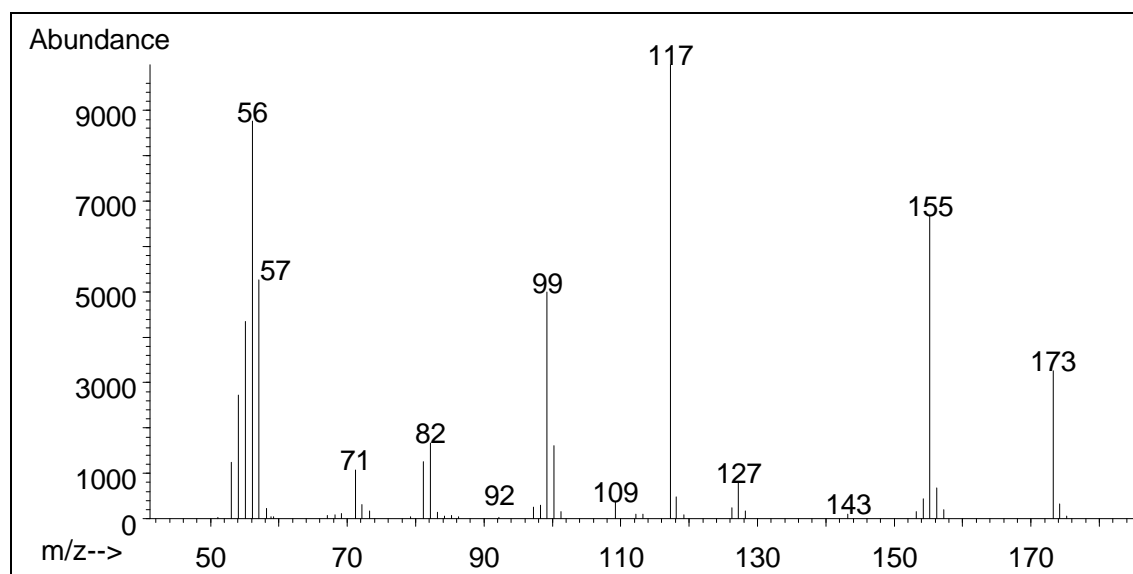
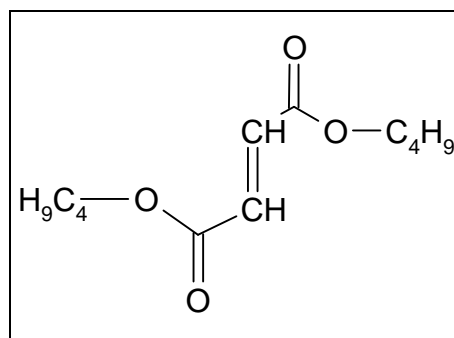


Fumarsäurederivat

Retentionszeit: 13,45 min

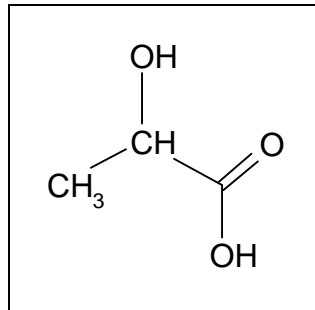
Molare Masse: 228 g/mol

Summenformel: $C_{12}H_{20}O_4$



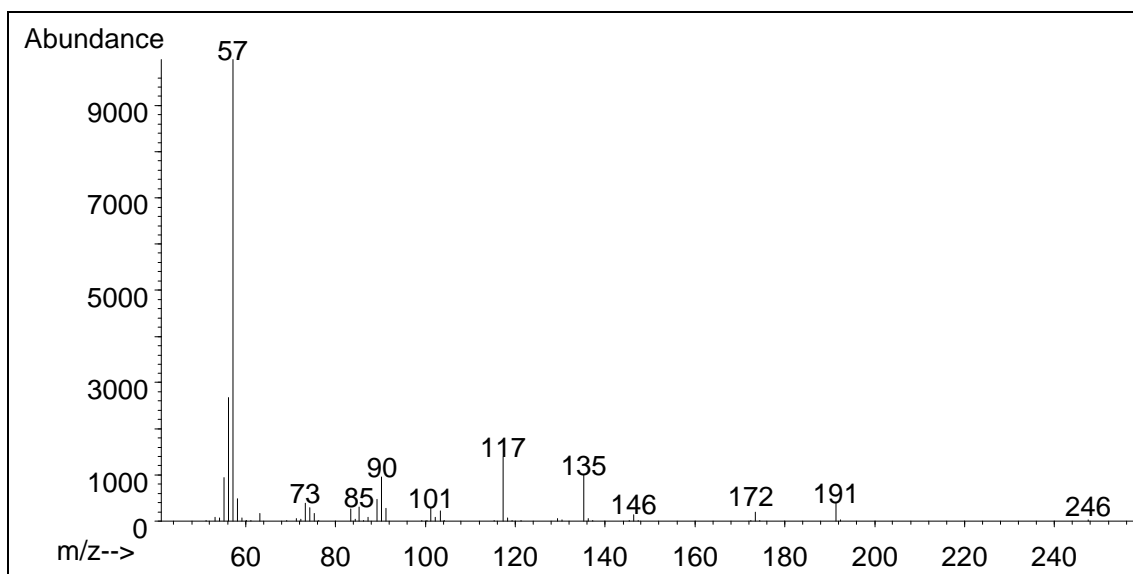
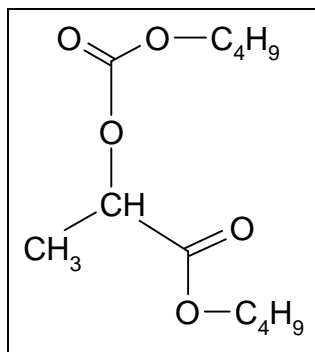
Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate**Milchsäure**

Molare Masse: 90 g/mol

Summenformel: $C_3H_6O_3$ **Milchsäurederivat**

Retentionszeit: 13,54 min

Molare Masse: 246 g/mol

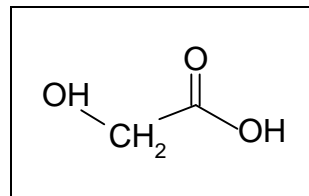
Summenformel: $C_{12}H_{22}O_5$ 

Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate

Glycolsäure

Molare Masse: 76 g/mol

Summenformel: $C_2H_4O_3$

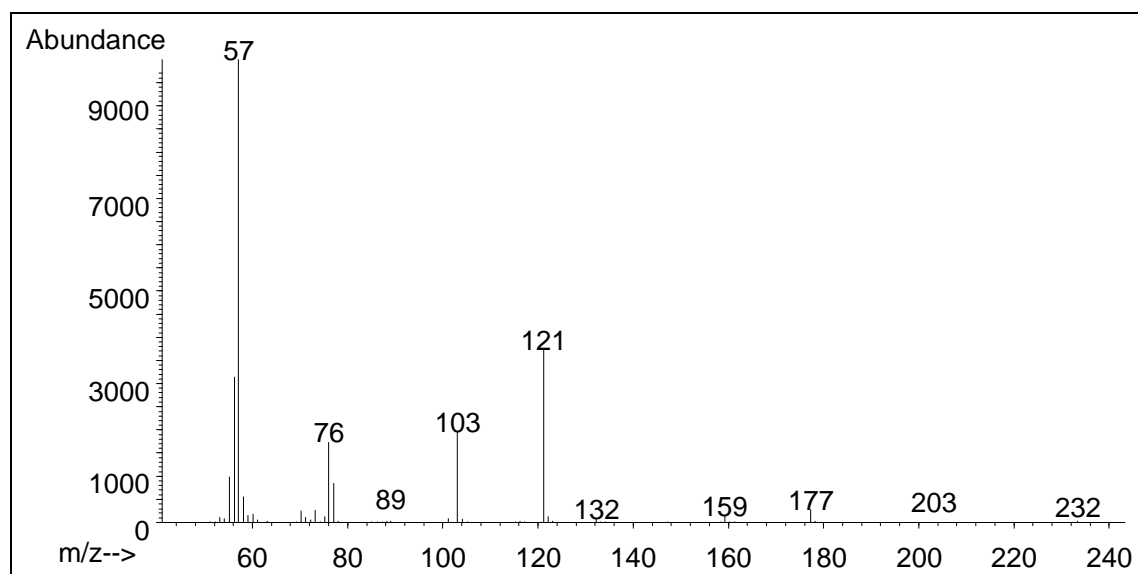
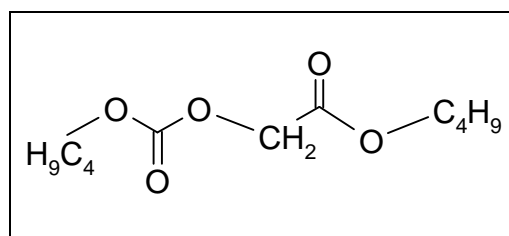


Glycolsäurederivat

Retentionszeit: 13,56 min

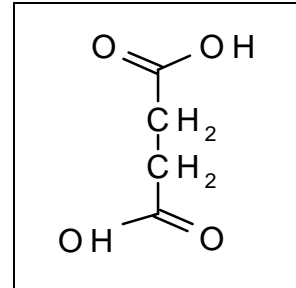
Molare Masse: 232 g/mol

Summenformel: $C_{11}H_{20}O_5$



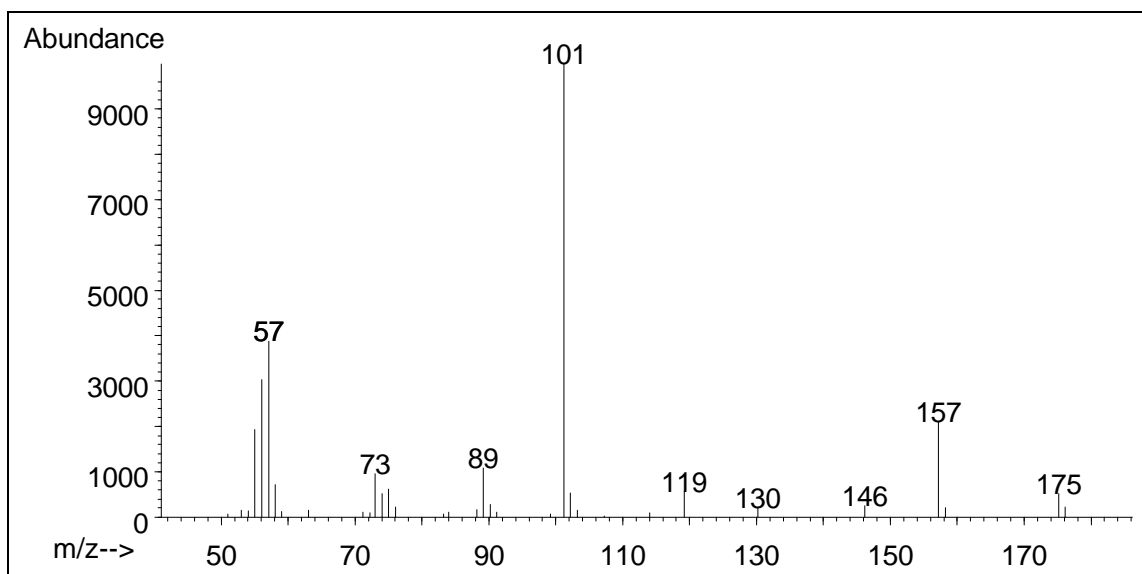
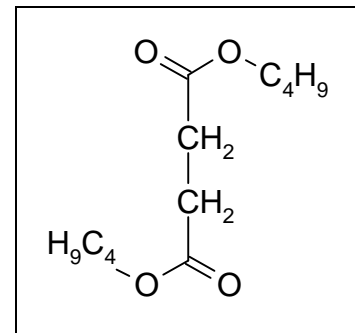
Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate**Bernsteinsäure**

Molare Masse: 118 g/mol

Summenformel: $C_4H_6O_4$ **Bernsteinsäurederivat**

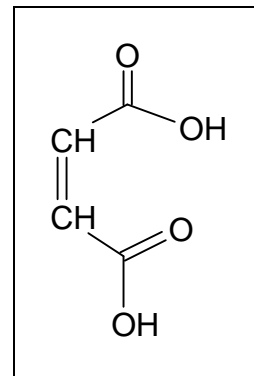
Retentionszeit: 13,65 min

Molare Masse: 230 g/mol

Summenformel: $C_{12}H_{22}O_4$ 

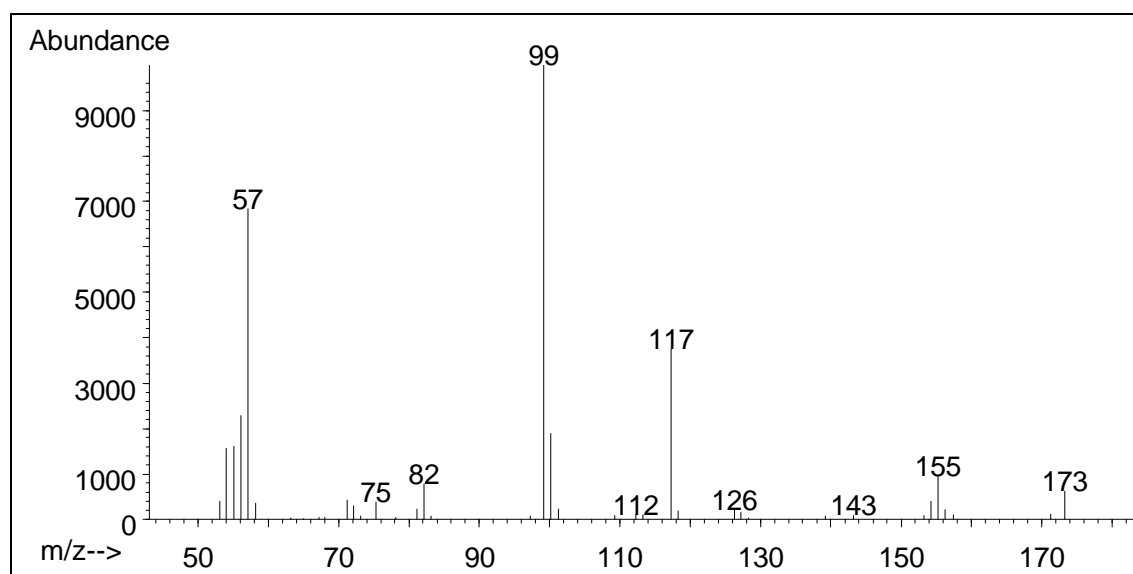
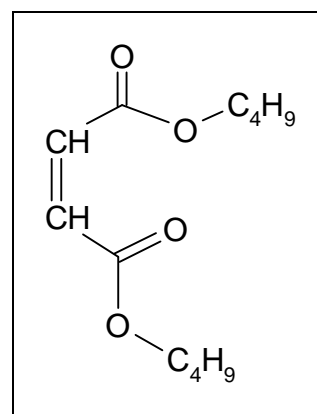
Anhang E: Massenspektren der Butylderivate**Maleinsäure**

Molare Masse: 116 g/mol

Summenformel: $C_4H_4O_4$ **Maleinsäurederivat**

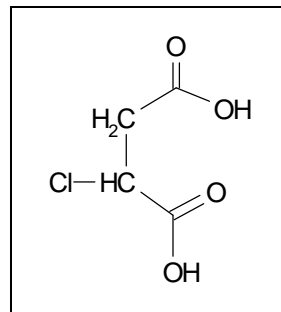
Retentionszeit: 13,85 min

Molare Masse: 228 g/mol

Summenformel: $C_{12}H_{20}O_4$ 

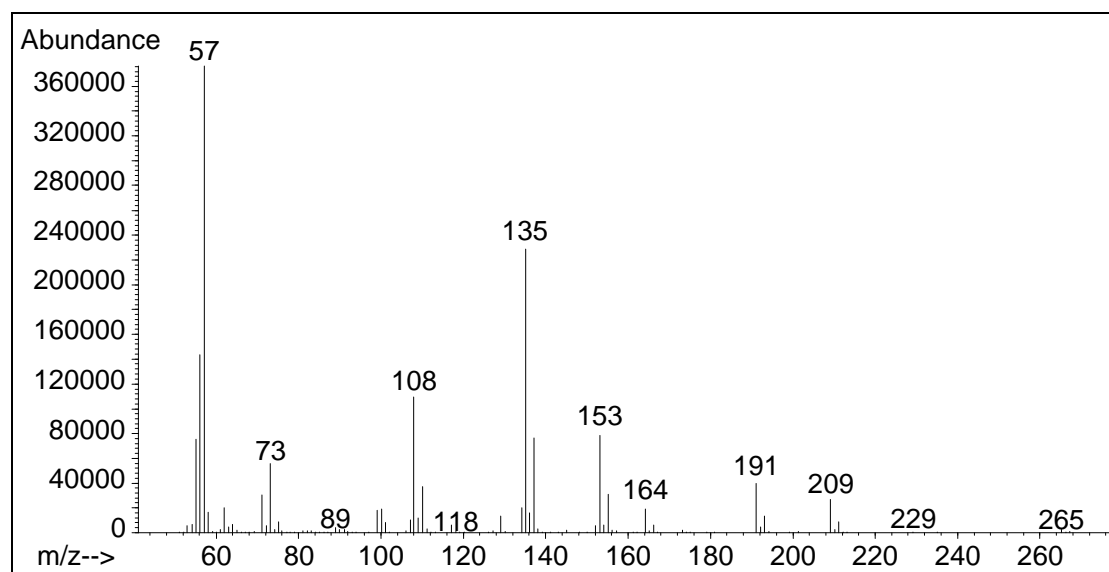
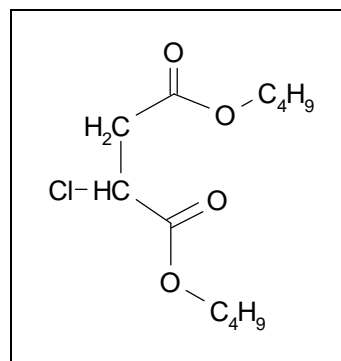
Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate**Chlorbernsteinsäure**

Molare Masse: 152 g/mol

Summenformel: $C_4H_5O_4Cl$ **Chlorbernsteinsäurederivat**

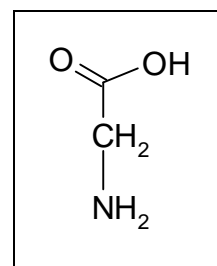
Retentionszeit: 15,59 min

Molare Masse: 264 g/mol

Summenformel: $C_{12}H_{21}O_4Cl$ 

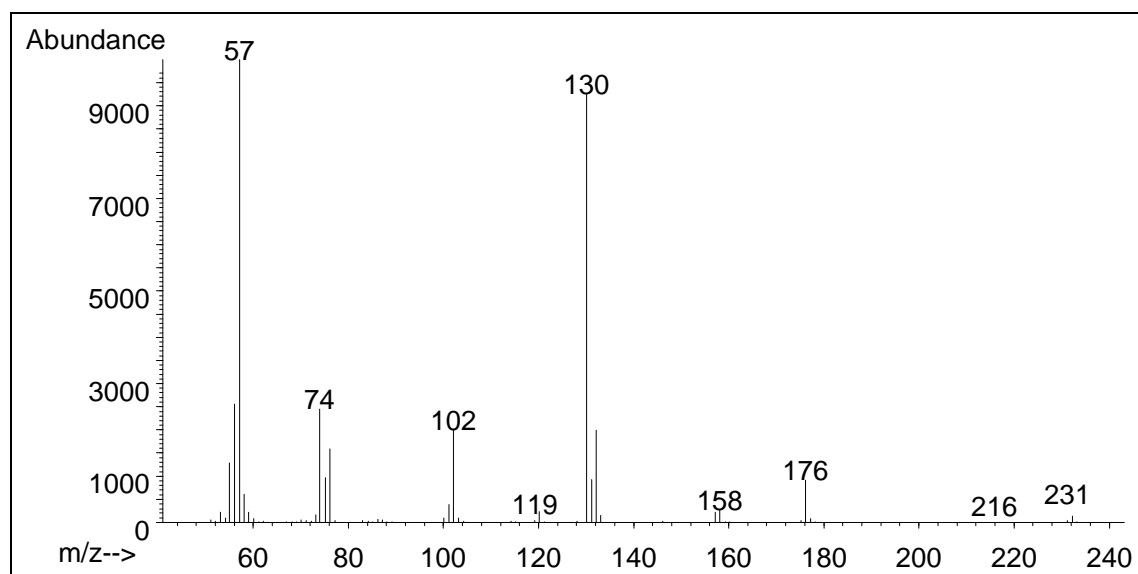
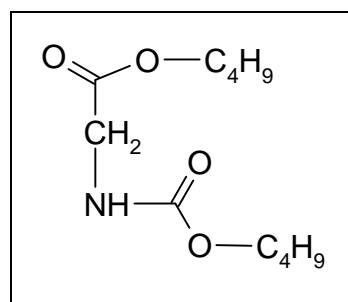
Anhang E: Massenspektren der Butylderivate**Glycin**

Molare Masse: 75 g/mol

Summenformel: $C_2H_5O_2N$ **Glycinderivat**

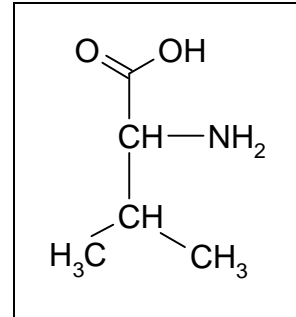
Retentionszeit: 16,97 min

Molare Masse: 231 g/mol

Summenformel: $C_{11}H_{21}O_4N$ 

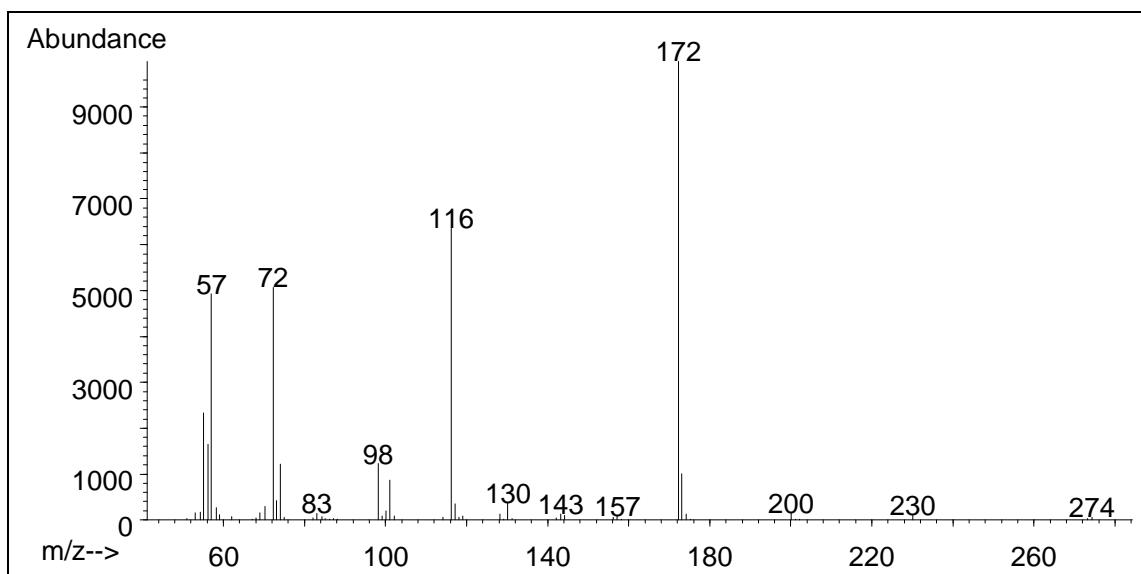
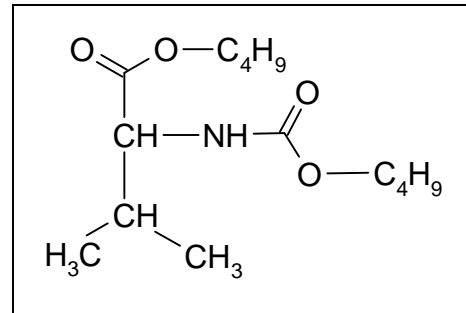
Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate**Valin**

Molare Masse: 117 g/mol

Summenformel: $C_5H_{11}O_2N$ **Valinderivat**

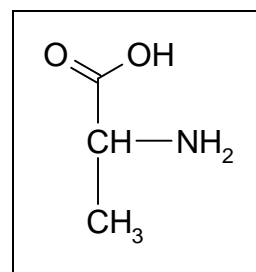
Retentionszeit: 17,97 min

Molare Masse: 273 g/mol

Summenformel: $C_{14}H_{27}O_4N$ 

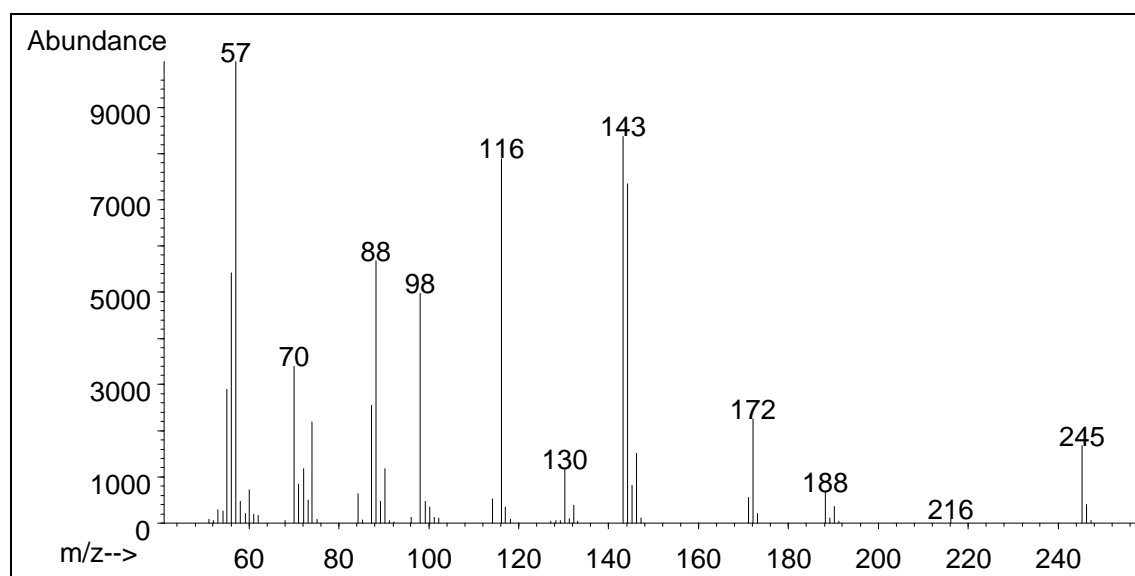
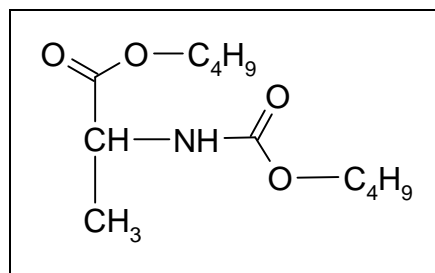
Anhang E: Massenspektren der Butylderivate**Alanin**

Molare Masse: 89 g/mol

Summenformel: $C_3H_7O_2N$ **Alaninderivat**

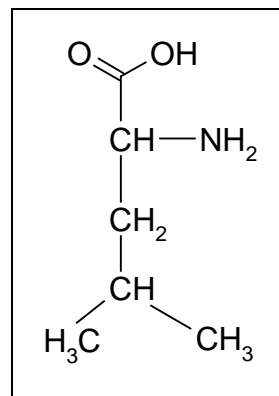
Retentionszeit: 18,91 min

Molare Masse: 245 g/mol

Summenformel: $C_{12}H_{23}O_4N$ 

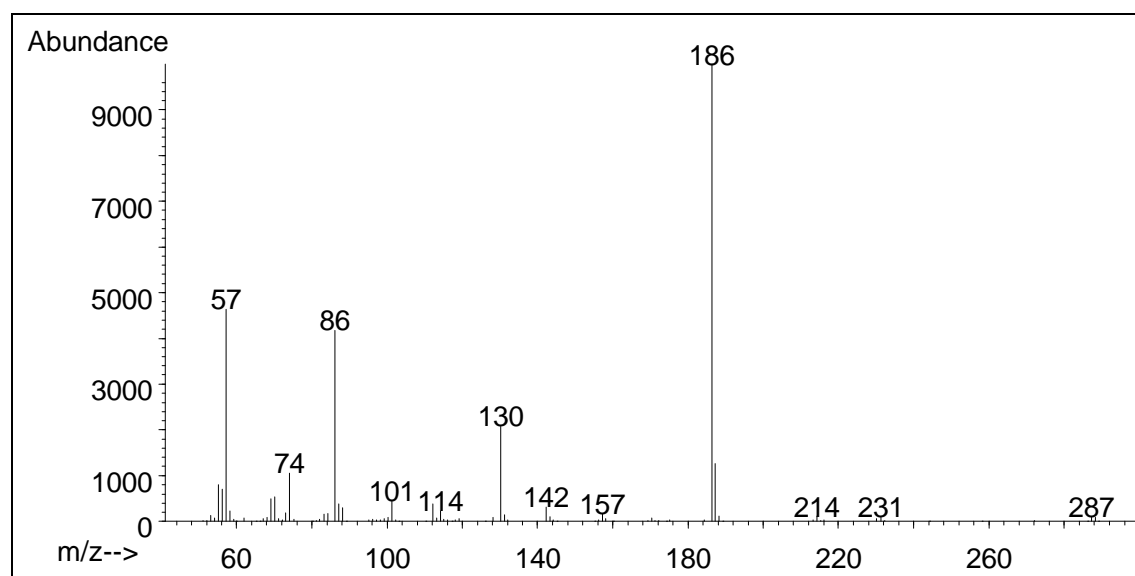
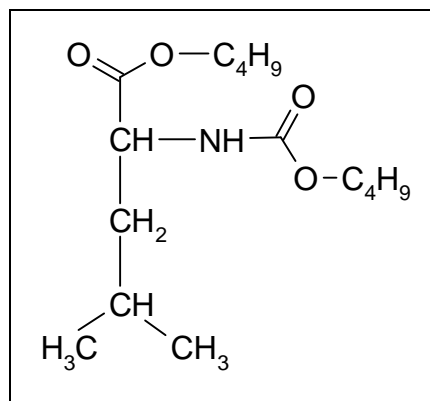
Anhang E: Massenspektren der Butylderivate**Leucin**

Molare Masse: 131 g/mol

Summenformel: $C_6H_{13}O_2N$ **Leucinderivat**

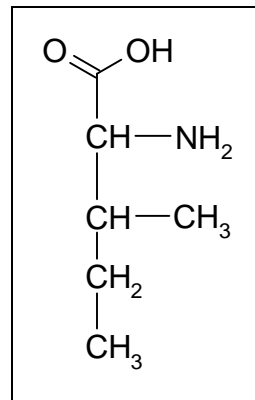
Retentionszeit: 19,31 min

Molare Masse: 287 g/mol

Summenformel: $C_{15}H_{29}O_4N$ 

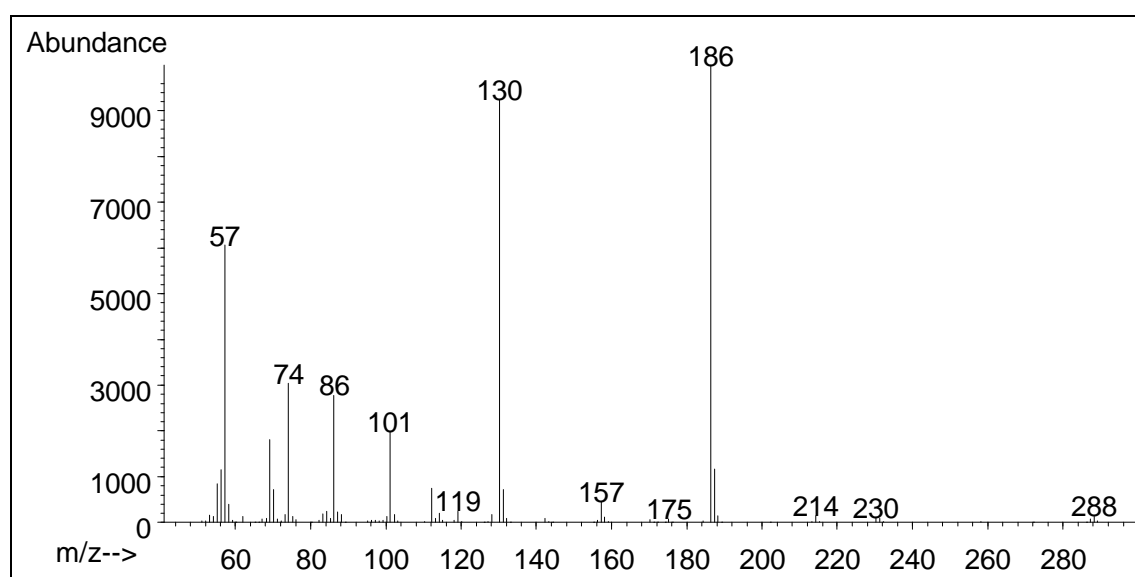
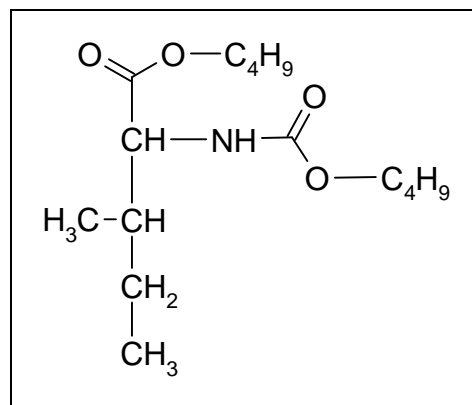
Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate**Isoleucin**

Molare Masse: 131 g/mol

Summenformel: $C_6H_{13}O_2N$ **Isoleucinderivat**

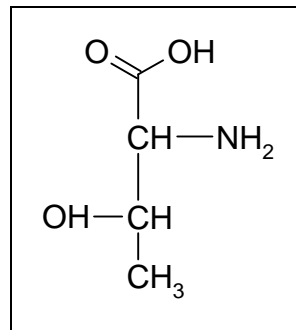
Retentionszeit: 19,66 min

Molare Masse: 287 g/mol

Summenformel: $C_{15}H_{29}O_4N$ 

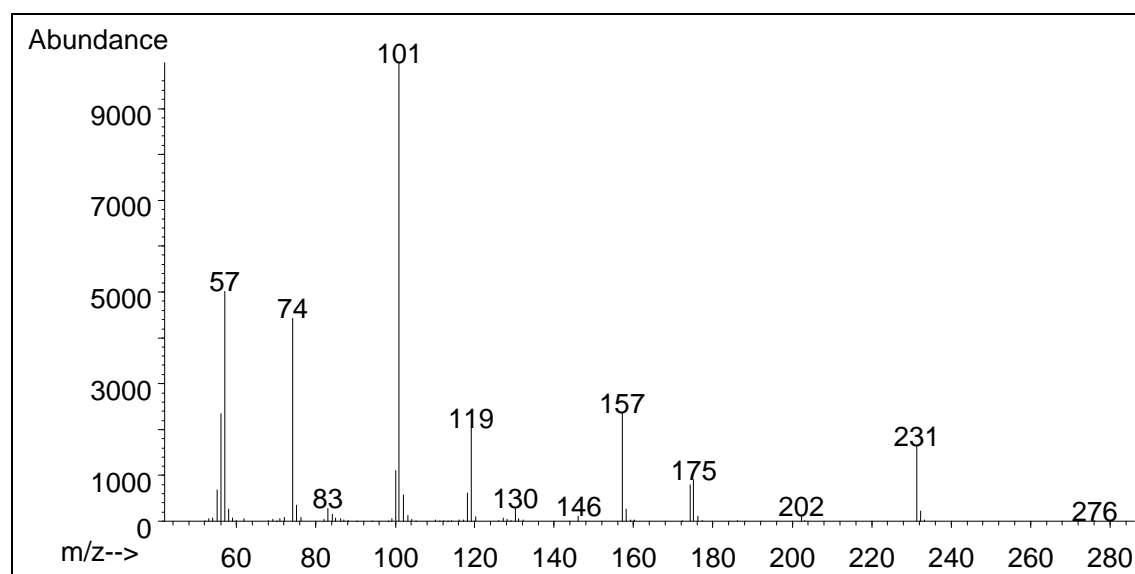
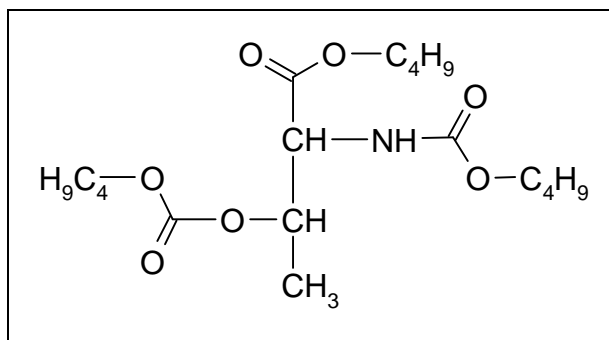
Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate**Threonin**

Molare Masse: 119 g/mol

Summenformel: $C_4H_9O_3N$ **Threoninderivat**

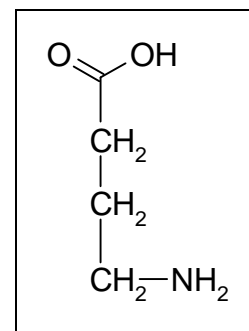
Retentionszeit: 21,26 min

Molare Masse: 375 g/mol

Summenformel: $C_{18}H_{33}O_7N$ 

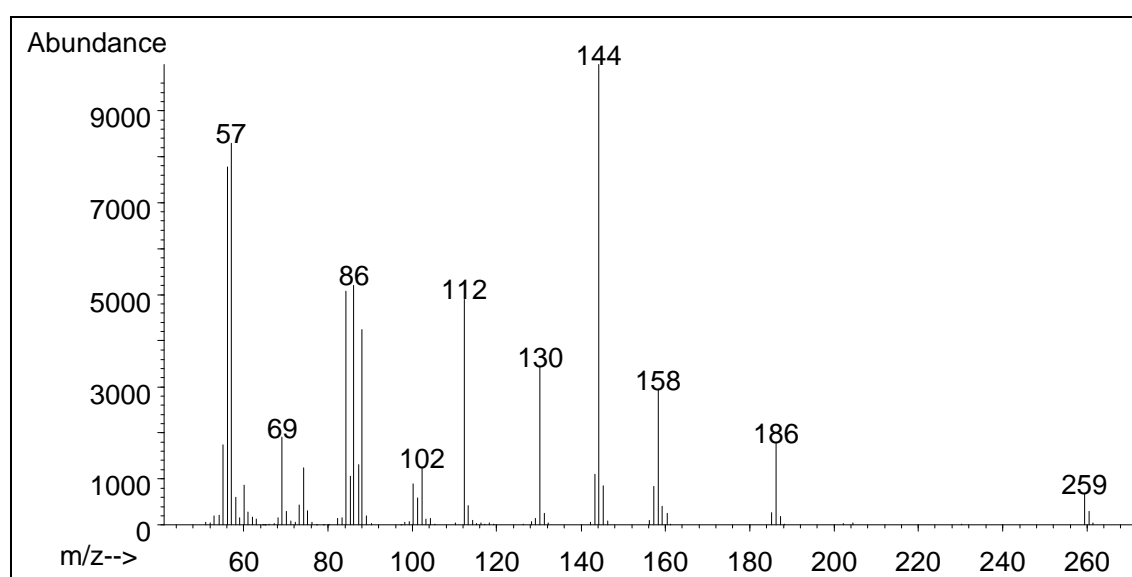
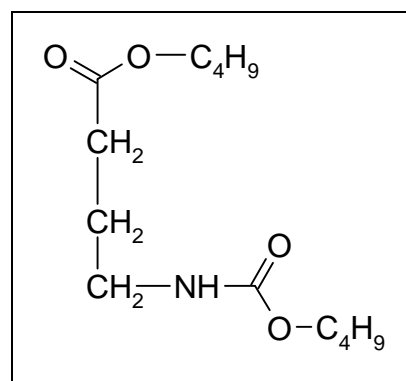
Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate **γ -Aminobuttersäure**

Molare Masse: 103 g/mol

Summenformel: $C_4H_9O_2N$  **γ -Aminobuttersäurederivat**

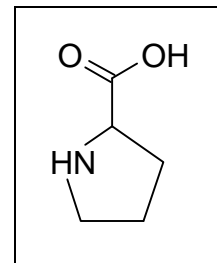
Retentionszeit: 21,59 min

Molare Masse: 259 g/mol

Summenformel: $C_{13}H_{25}O_4N$ 

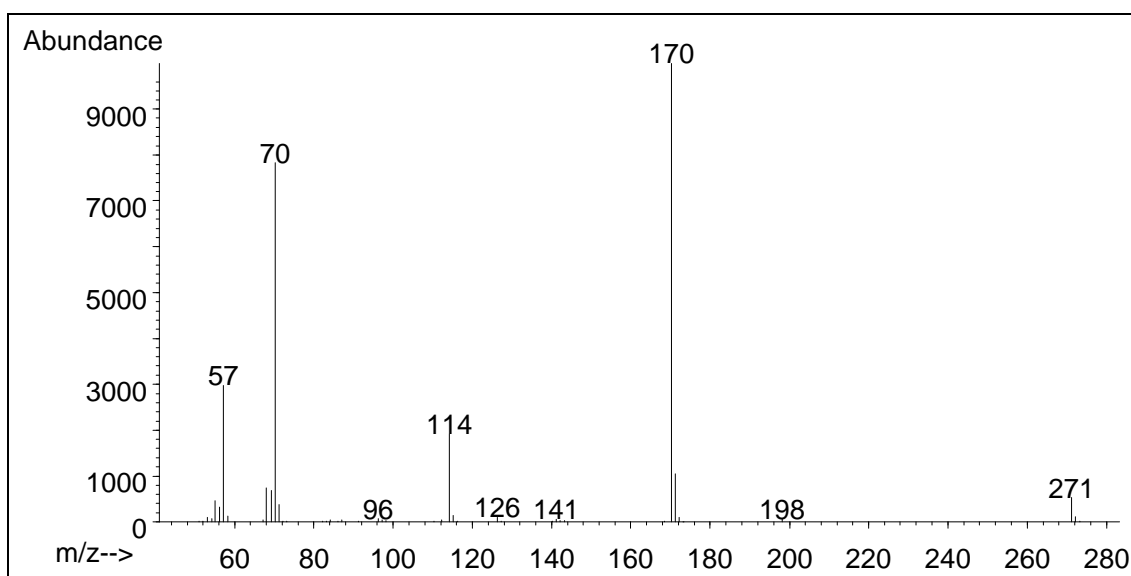
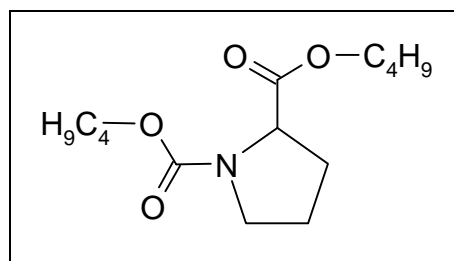
Anhang E: Massenspektren der Butylderivate**Prolin**

Molare Masse: 115 g/mol

Summenformel: $C_5H_9O_2N$ **Prolinderivat**

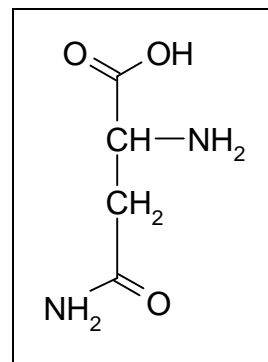
Retentionszeit: 21,73 min

Molare Masse: 271 g/mol

Summenformel: $C_{14}H_{25}O_4N$ 

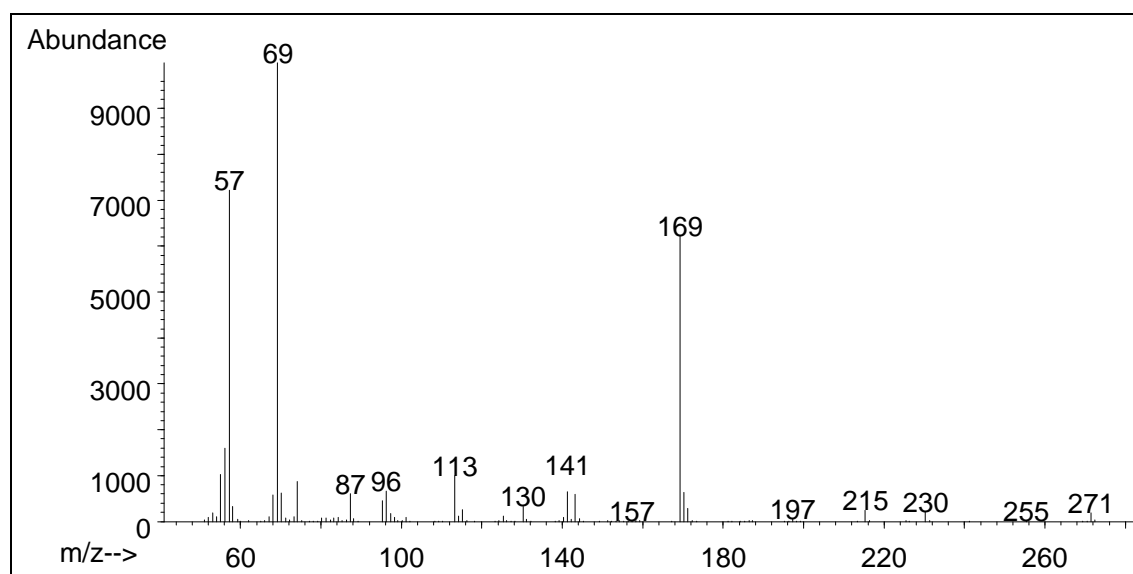
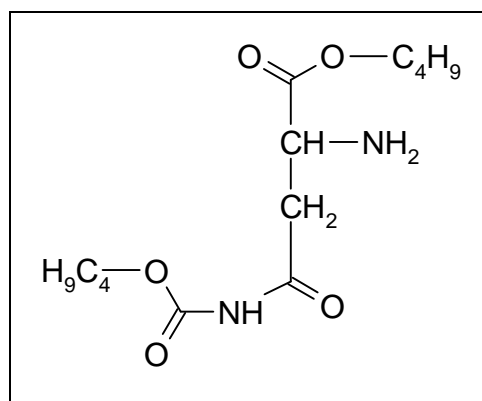
Anhang E: Massenspektren der Butylderivate**Asparagin**

Molare Masse: 132 g/mol

Summenformel: $C_4H_8O_3N_2$ **Asparaginderivat**

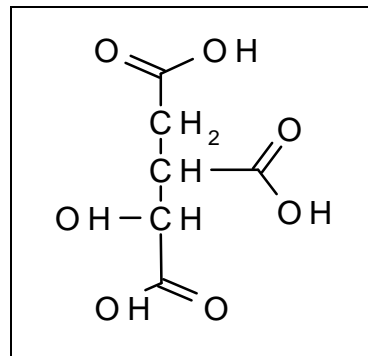
Retentionszeit: 22,53 min

Molare Masse: 288 g/mol

Summenformel: $C_{13}H_{24}O_5N_2$ 

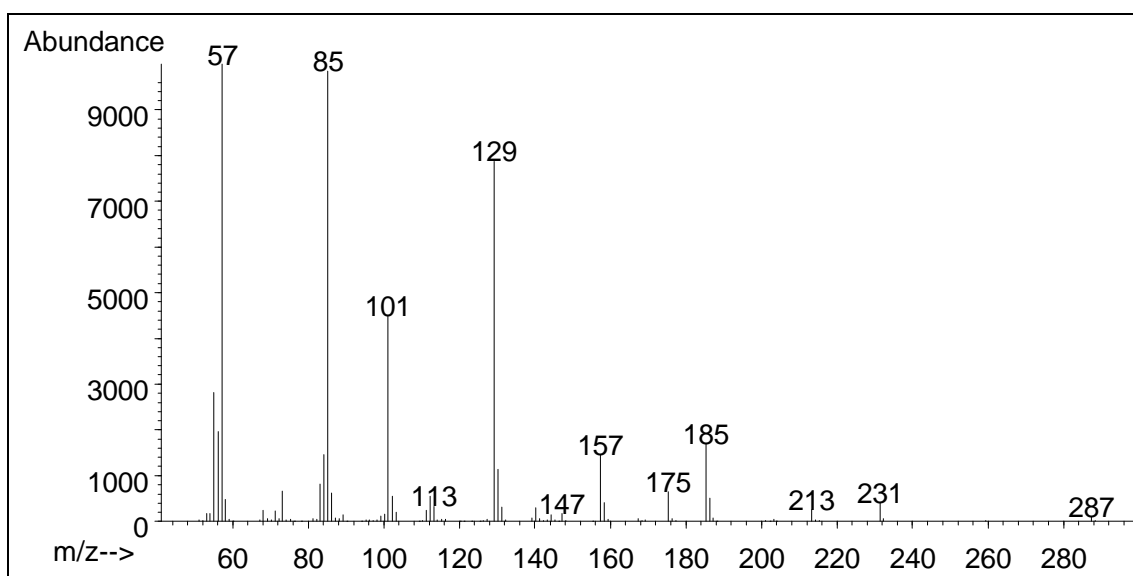
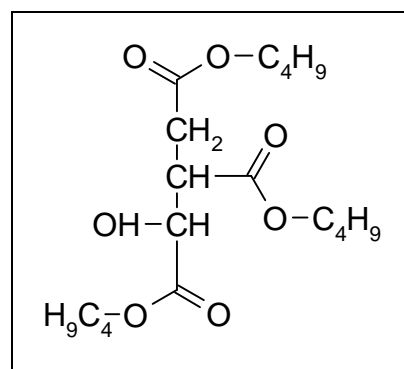
Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate**Isocitronensäure**

Molare Masse: 192 g/mol

Summenformel: $C_6H_8O_7$ **Isocitronensäurederivat**

Retentionszeit: 25,23 min

Molare Masse: 360 g/mol

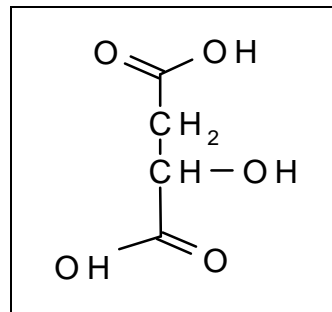
Summenformel: $C_{18}H_{32}O_7$ 

Anhang E: Massenspektren der Butylderivate

Äpfelsäure

Molare Masse: 134 g/mol

Summenformel: $C_4H_6O_5$

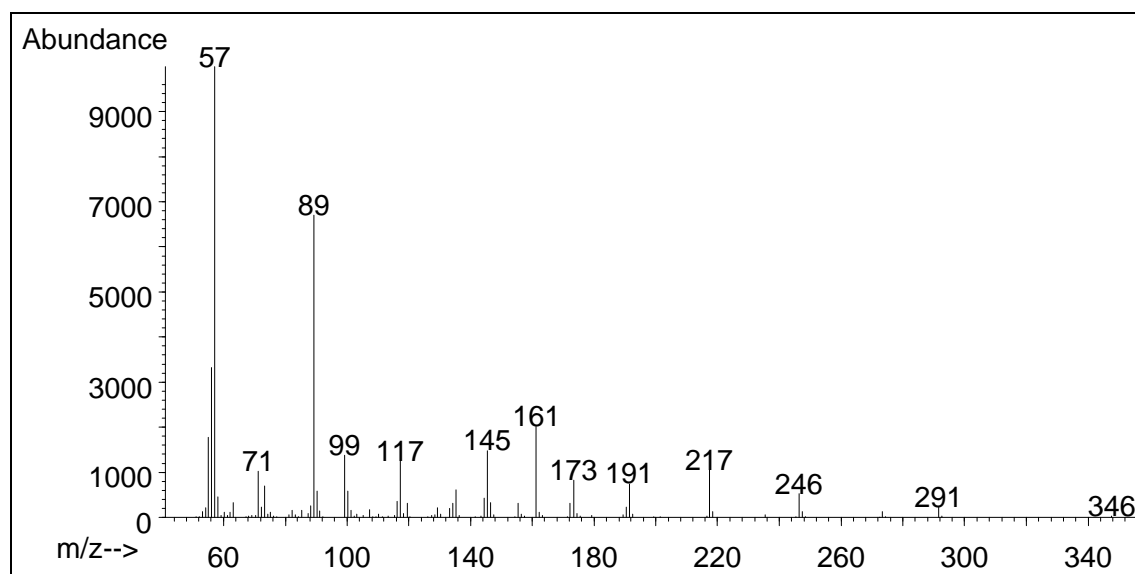
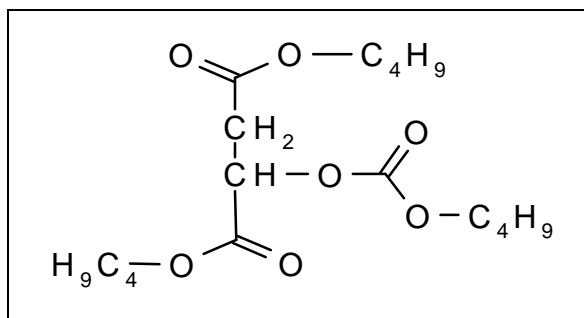


Äpfelsäurederivat

Retentionszeit: 26,22 min

Molare Masse: 346 g/mol

Summenformel: $C_{17}H_{30}O_7$

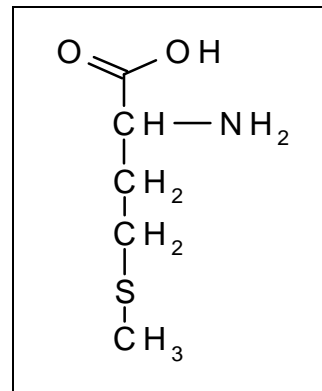


Anhang E: Massenspektren der Butylderivate

Methionin

Molare Masse: 149 g/mol

Summenformel: $C_5H_{11}O_2NS$

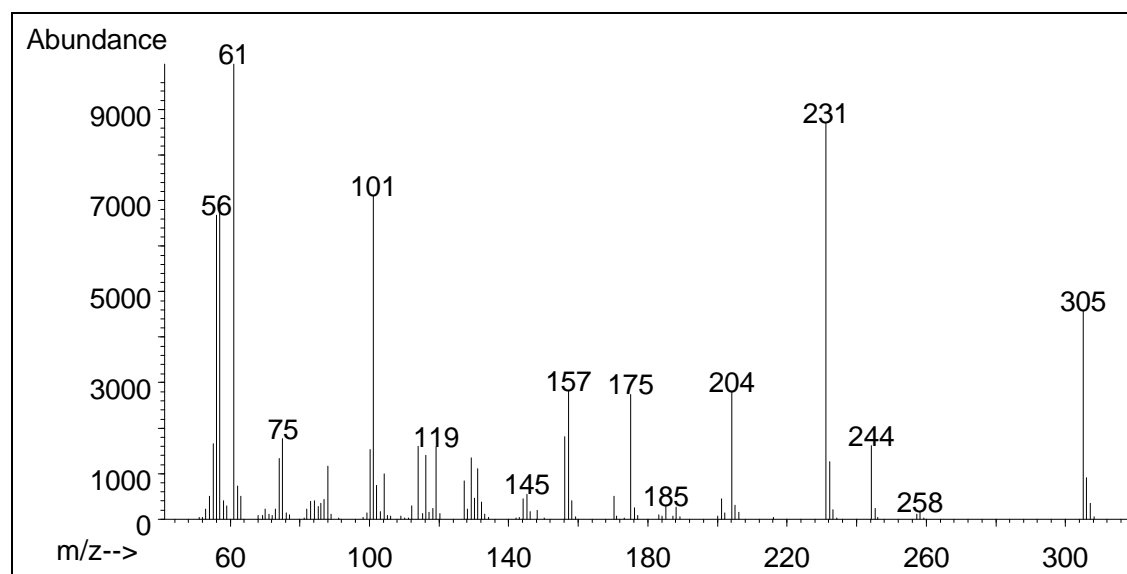
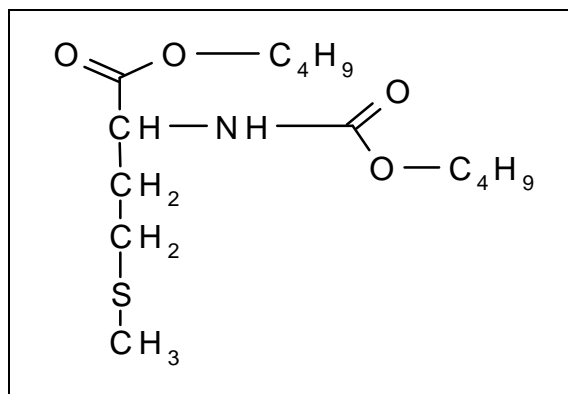


Methioninderivat

Retentionszeit: 26,47 min

Molare Masse: 305 g/mol

Summenformel: $C_{14}H_{27}O_4NS$

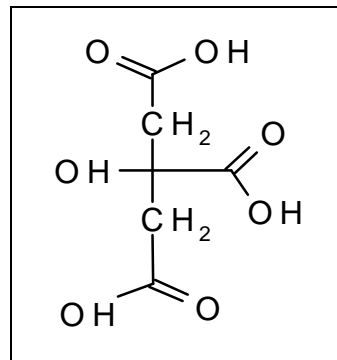


Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate

Citronensäure

Molare Masse: 192 g/mol

Summenformel: $C_6H_8O_7$

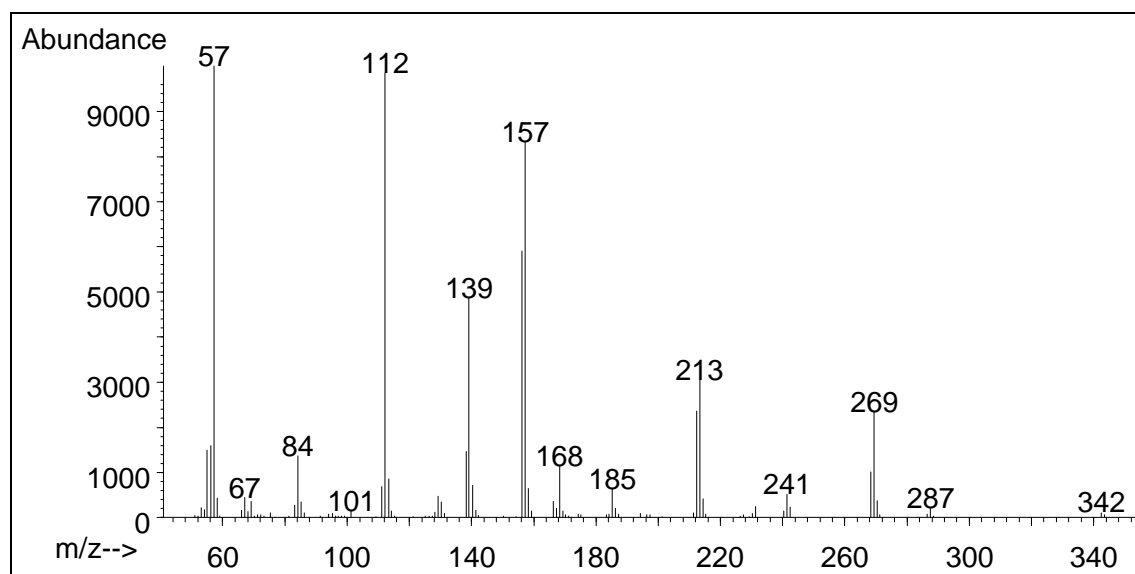
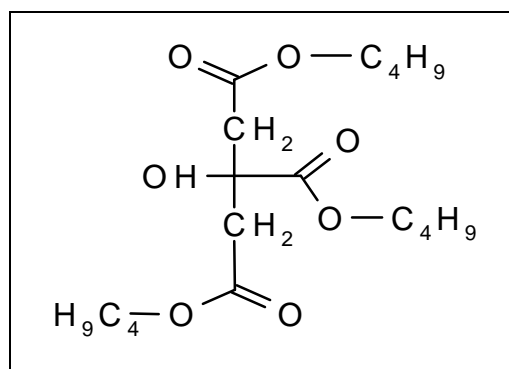


Citronensäurederivat

Retentionszeit: 26,78 min

Molare Masse: 360 g/mol

Summenformel: $C_{18}H_{32}O_7$

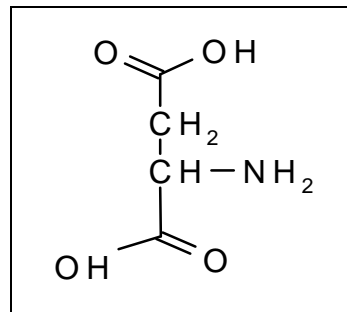


Anhang E: Massenspektren der Butylderivate

Asparaginsäure

Molare Masse: 133 g/mol

Summenformel: $C_4H_7O_4N$

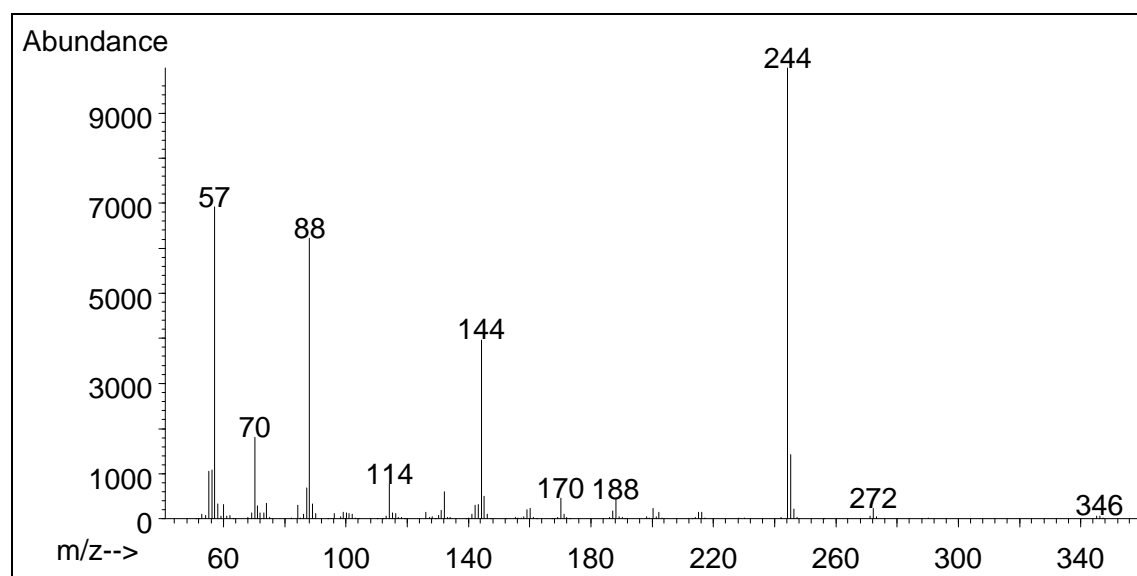
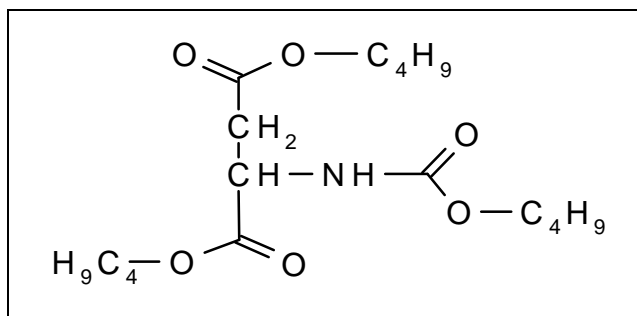


Asparaginsäurederivat

Retentionszeit: 27,56 min

Molare Masse: 345 g/mol

Summenformel: $C_{17}H_{31}O_6N$

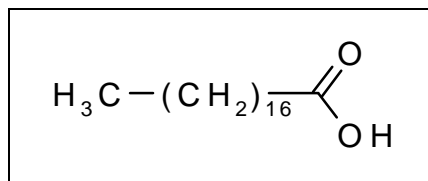


Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate

Stearinsäure

Molare Masse: 284 g/mol

Summenformel: $C_{18}H_{36}O_2$

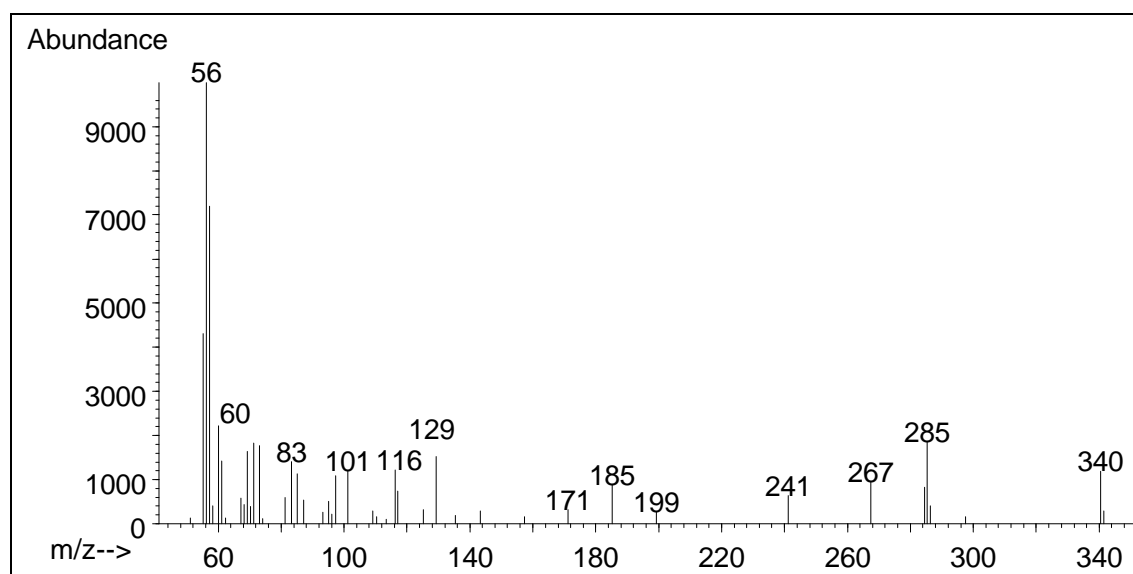
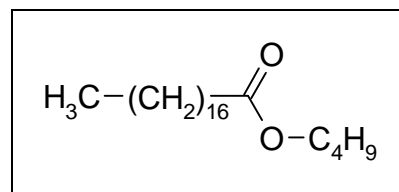


Stearinsäurederivat

Retentionszeit: 28,59 min

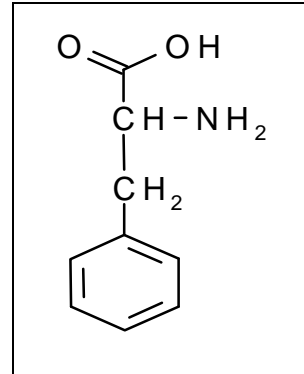
Molare Masse: 340 g/mol

Summenformel: $C_{22}H_{44}O_2$



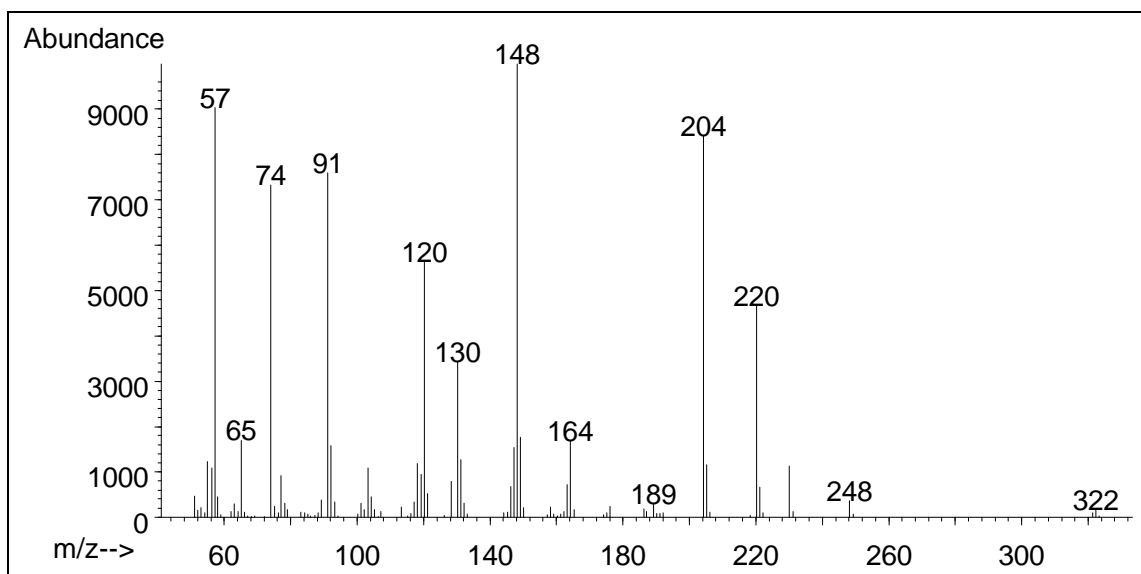
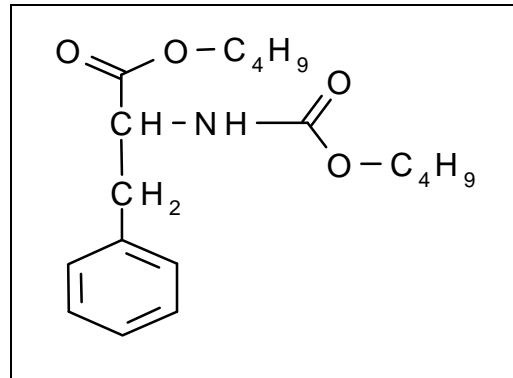
Anhang E: Massenspektren der Butylderivate**Phenylalanin**

Molare Masse: 165 g/mol

Summenformel: $C_9H_{11}O_2N$ **Phenylalaninderivat**

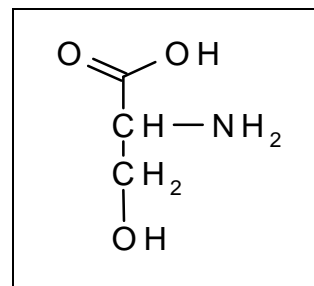
Retentionszeit: 28,38 min

Molare Masse: 321 g/mol

Summenformel: $C_{18}H_{27}O_4N$ 

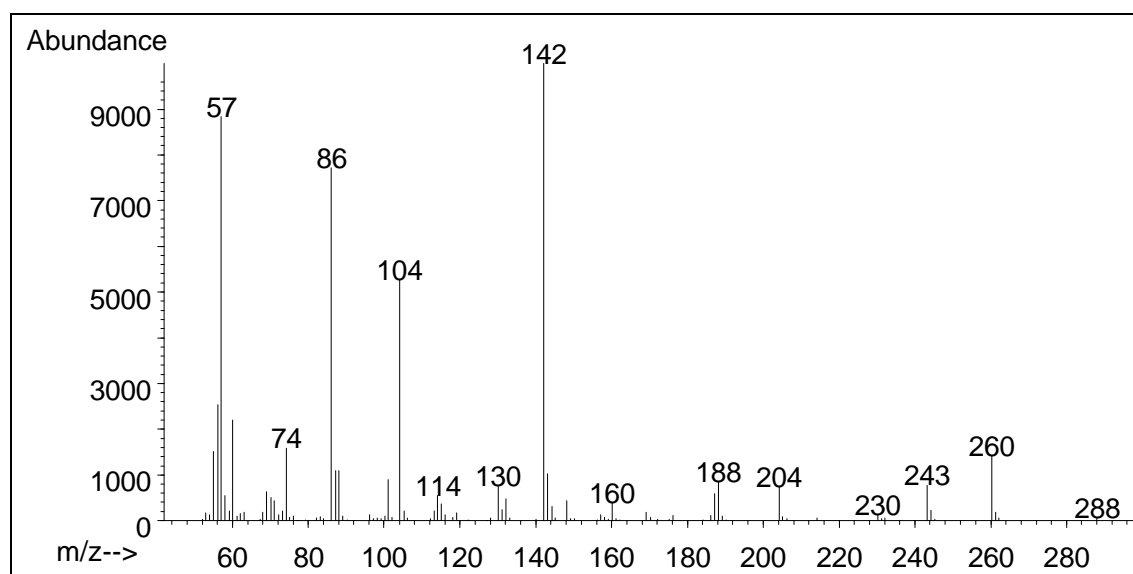
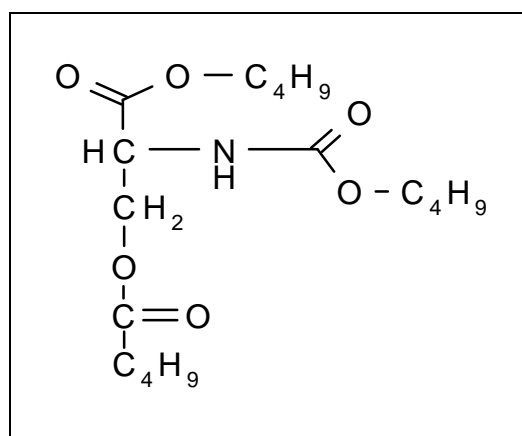
Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate**Serin**

Molare Masse: 105 g/mol

Summenformel: $C_3H_7O_3N$ **Serinderivat**

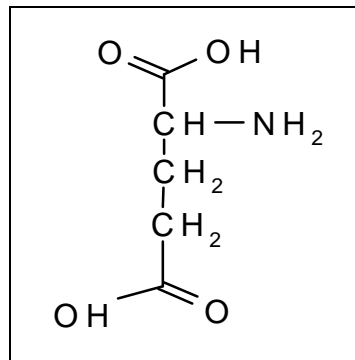
Retentionszeit: 28,83 min

Molare Masse: 361 g/mol

Summenformel: $C_{17}H_{31}O_7N$ 

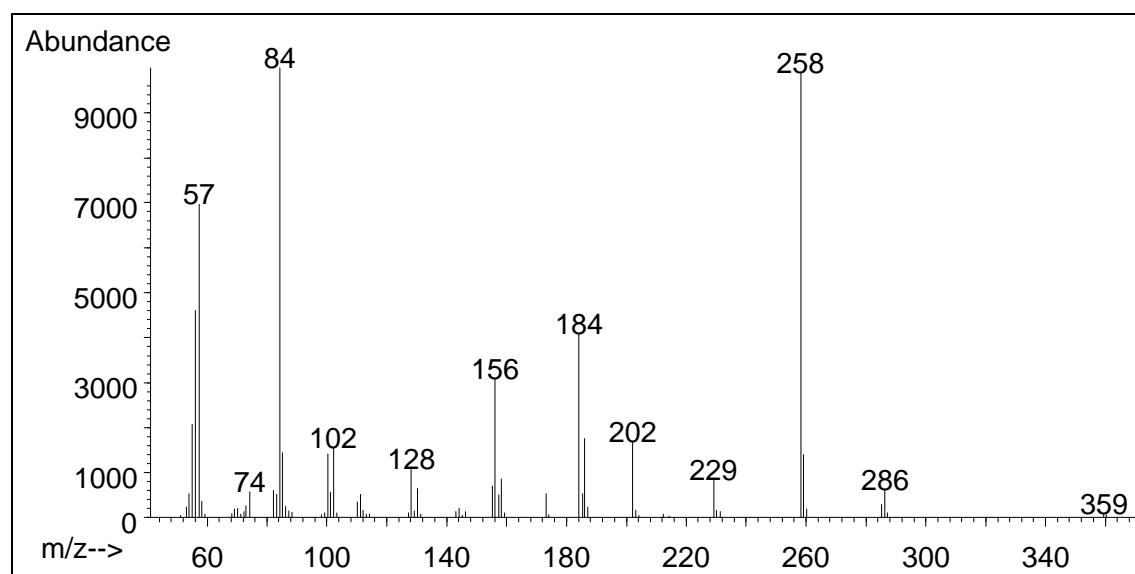
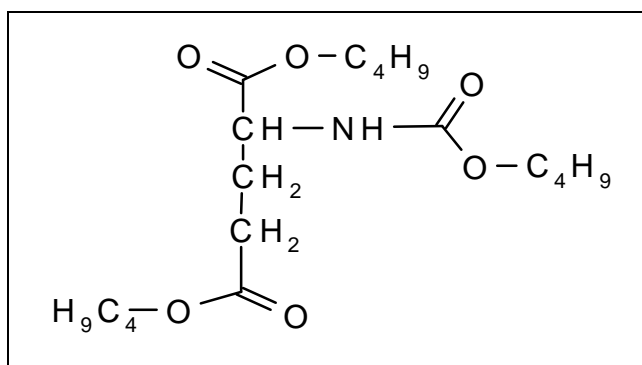
Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate**Glutaminsäure**

Molare Masse: 147 g/mol

Summenformel: $C_5H_9O_4N$ **Glutaminsäurederivat**

Retentionszeit: 29,26 min

Molare Masse: 359 g/mol

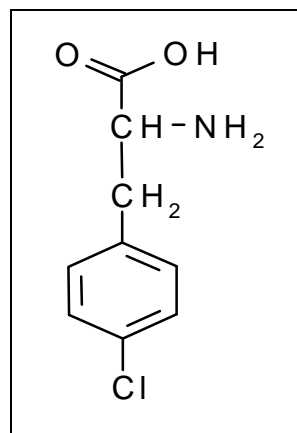
Summenformel: $C_{18}H_{33}O_6N$ 

Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate

Chlorphenylalanin (ISTD)

Molare Masse: 199 g/mol

Summenformel: $C_9H_{10}O_2NCl$

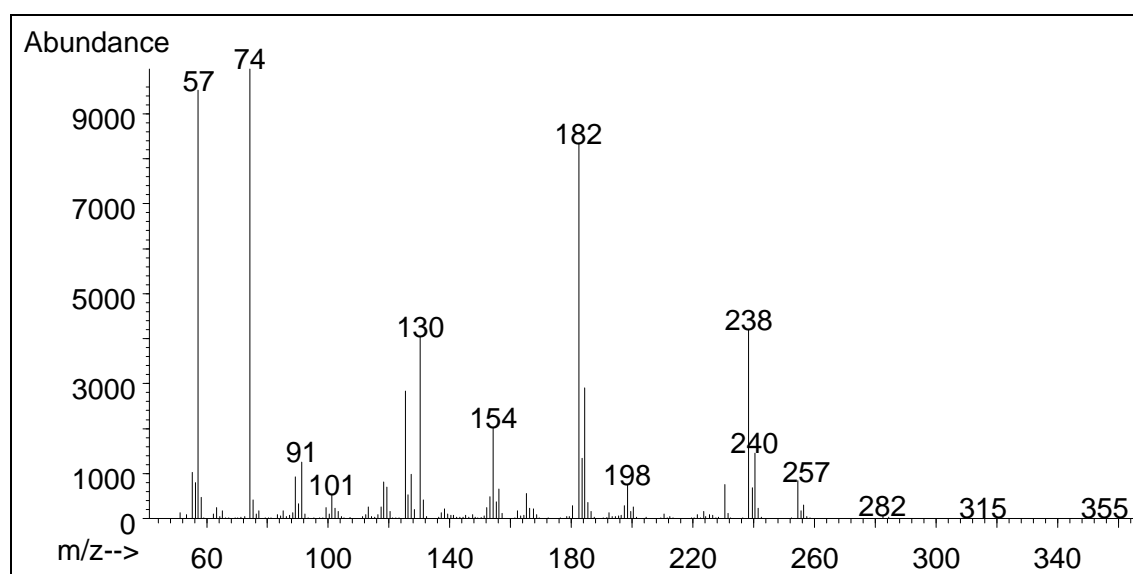
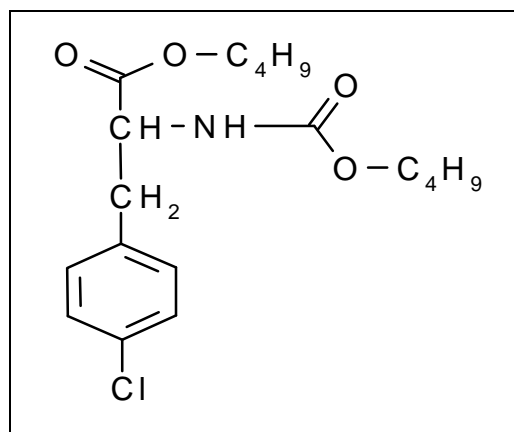


Chlorphenylalaninderivat (ISTD)

Retentionszeit: 30,99 min

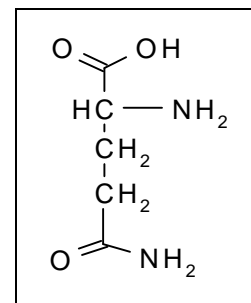
Molare Masse: 356 g/mol

Summenformel: $C_{18}H_{27}O_4NCl$



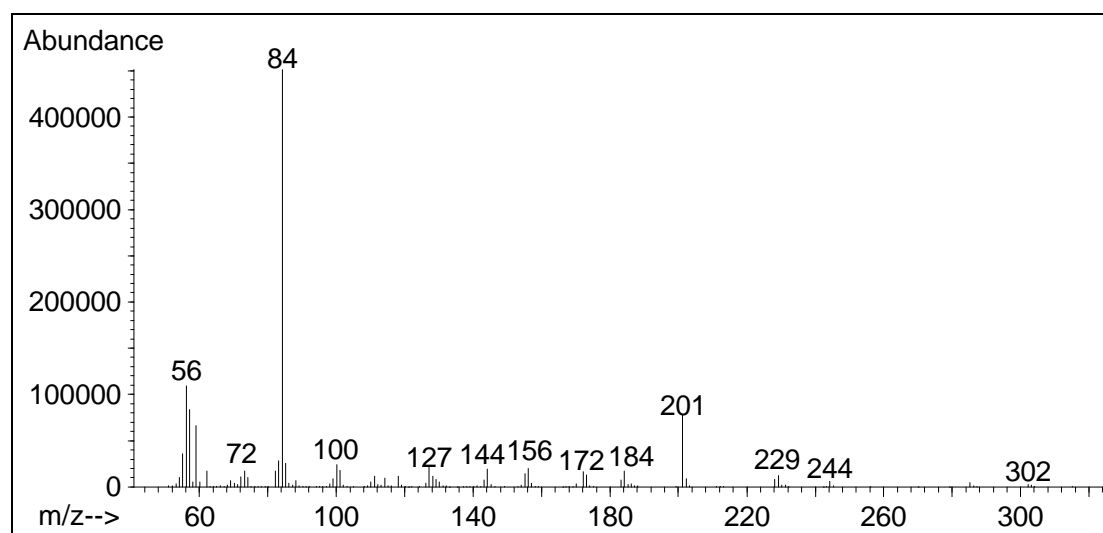
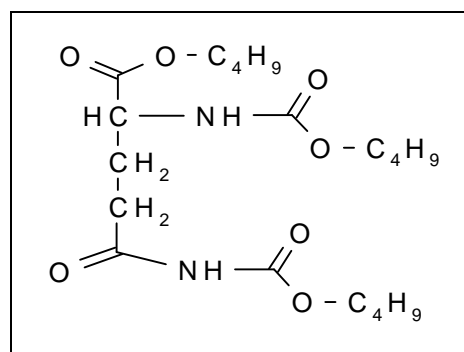
Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate**Glutamin**

Molare Masse: 146 g/mol

Summenformel: $C_5H_{10}O_3N_2$ **Glutaminderivat**

Retentionszeit: 32,33 min

Molare Masse: 302 g/mol

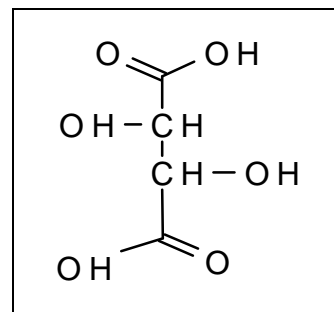
Summenformel: $C_{14}H_{26}O_5N_2$ 

Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate

Weinsäure

Molare Masse: 150 g/mol

Summenformel: $C_4H_6O_6$

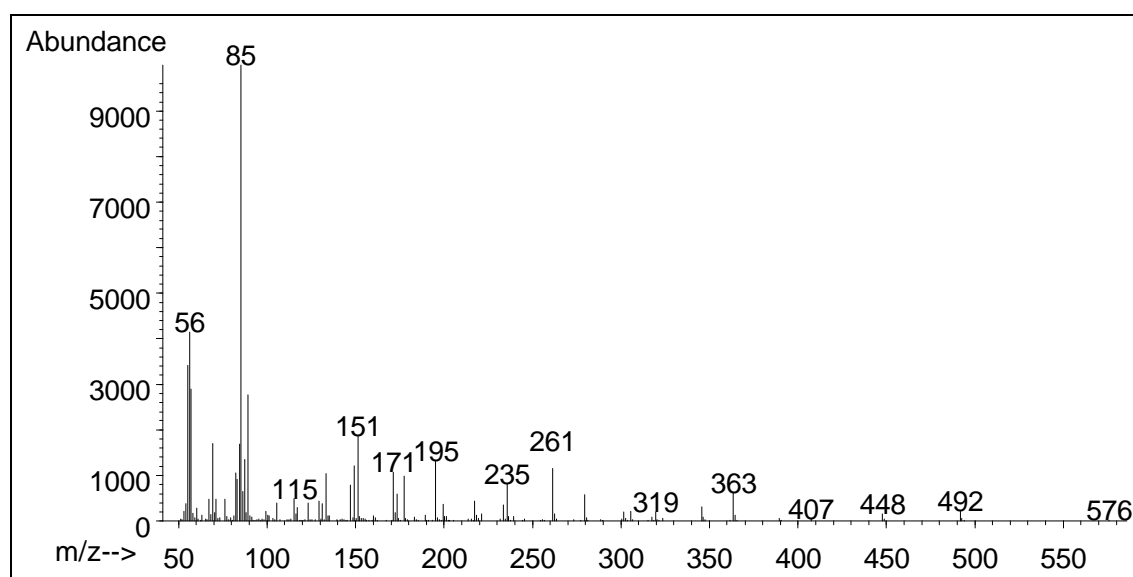
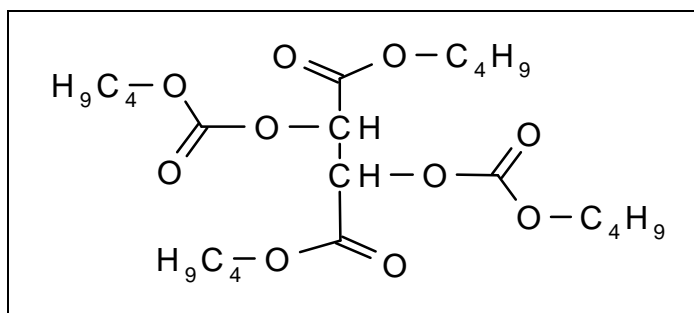


Weinsäurederivat

Retentionszeit: 35,50 min

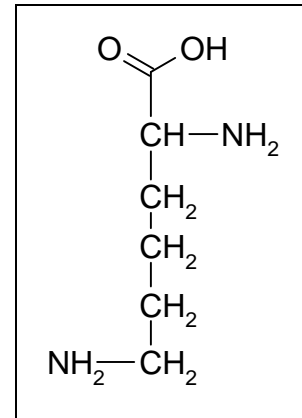
Molare Masse: 462 g/mol

Summenformel: $C_{22}H_{38}O_{10}$



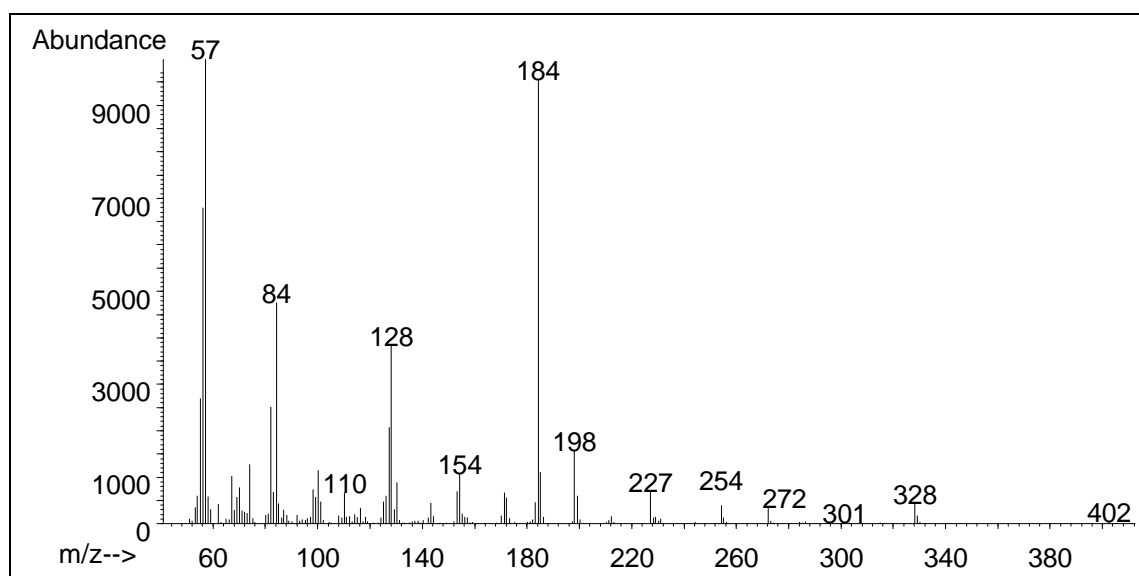
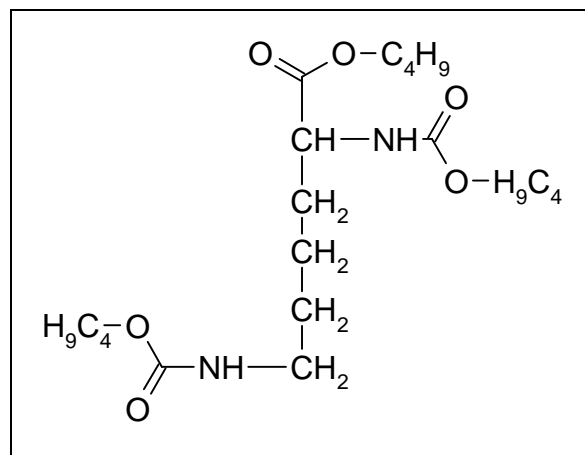
Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate**Lysin**

Molare Masse: 132 g/mol

Summenformel: $C_6H_{14}O_2N_2$ **Lysinderivat**

Retentionszeit: 40,90 min

Molare Masse: 402 g/mol

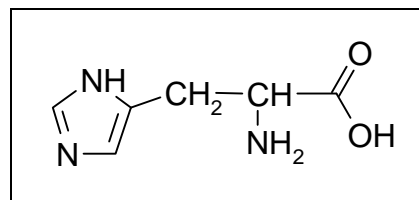
Summenformel: $C_{20}H_{38}O_6N_2$ 

Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate

Histidin

Molare Masse: 155 g/mol

Summenformel: $C_6H_9O_2N_3$

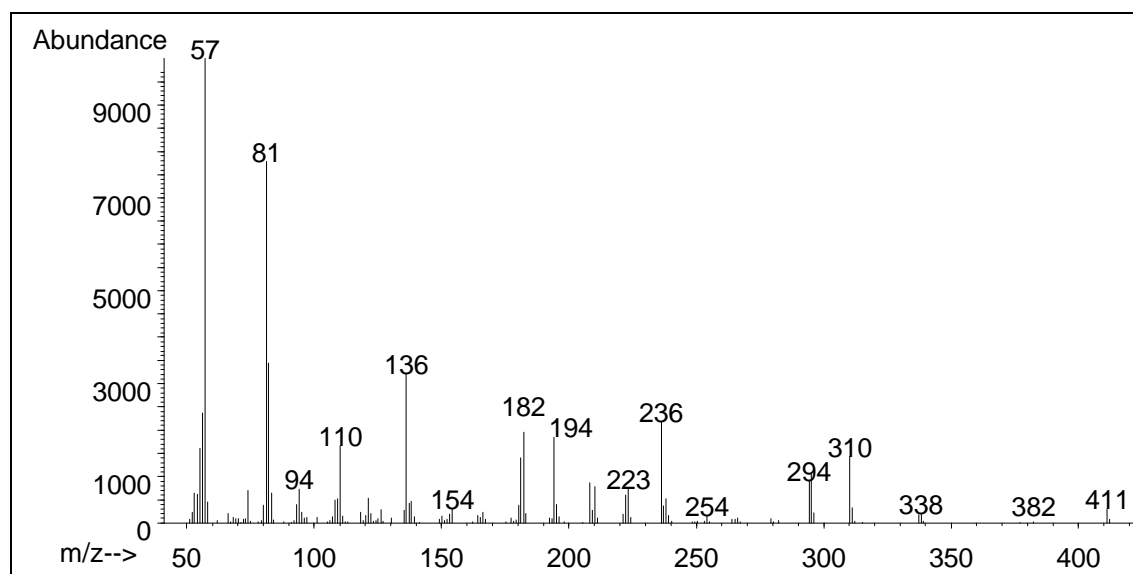
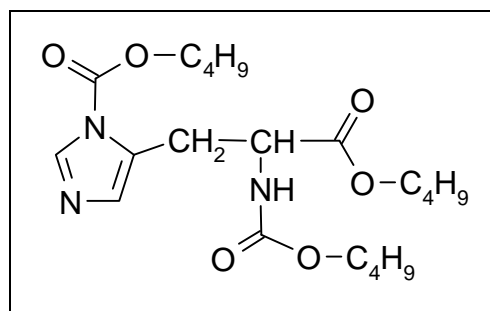


Histidinderivat

Retentionszeit: 43,14 min

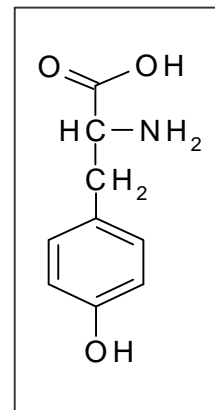
Molare Masse: 411 g/mol

Summenformel: $C_{20}H_{33}O_6N_3$



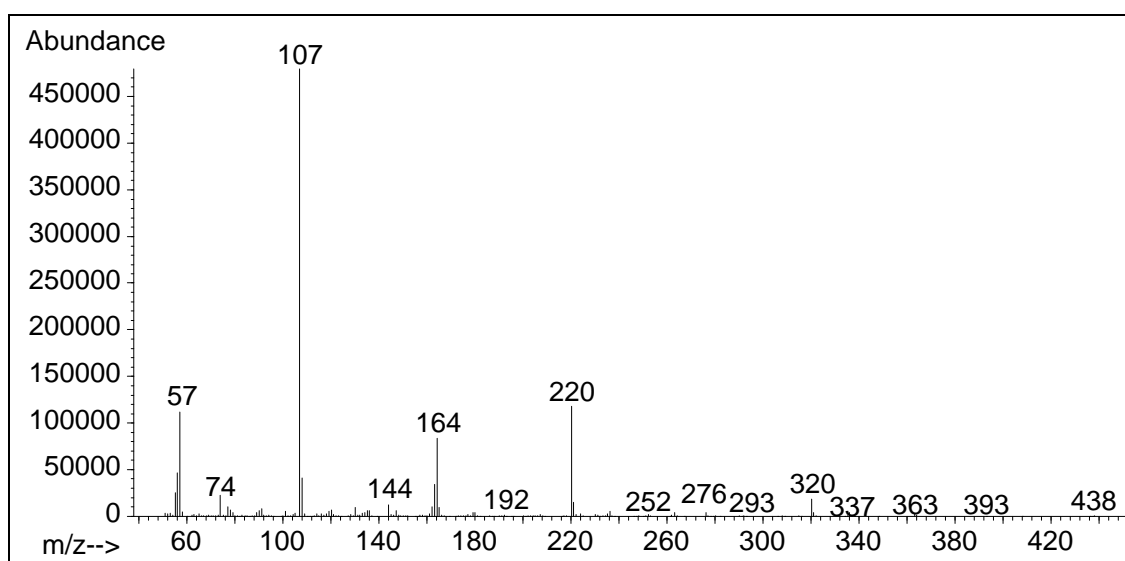
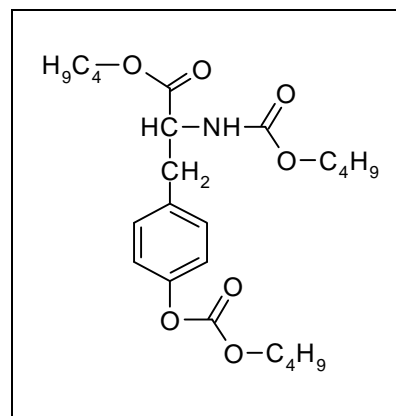
Anhang E: Massenspektren der Butylderivate**Tyrosin**

Molare Masse: 181 g/mol

Summenformel: $C_9H_{11}O_3N$ **Tyrosinderivat**

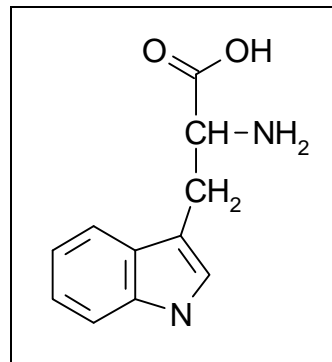
Retentionszeit: 46,38 min

Molare Masse: 437 g/mol

Summenformel: $C_{23}H_{35}O_7N$ 

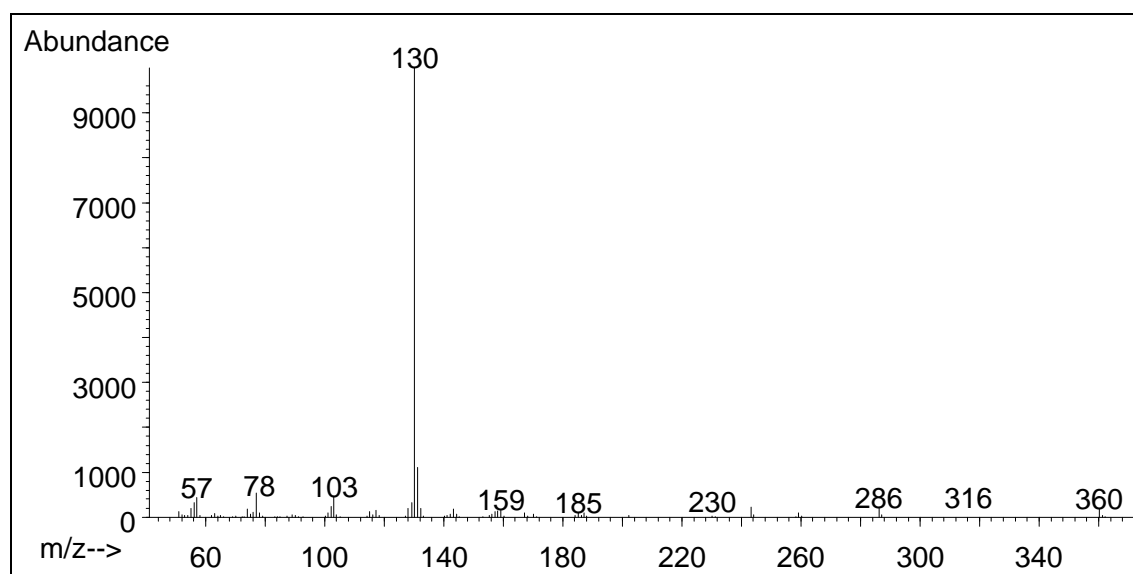
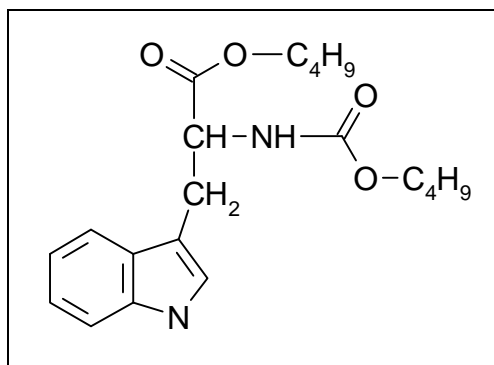
Anhang E: Massenspektren der Butyllderivate**Tryptophan**

Molare Masse: 204 g/mol

Summenformel: $C_{11}H_{12}O_2N_2$ **Tryptophanderivat**

Retentionszeit: 48,73 min

Molare Masse: 360 g/mol

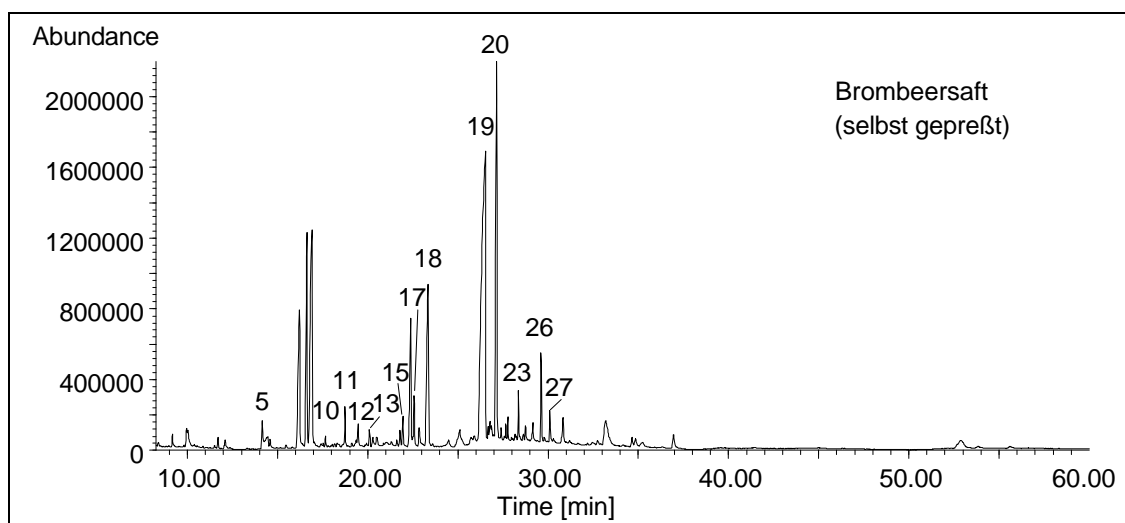
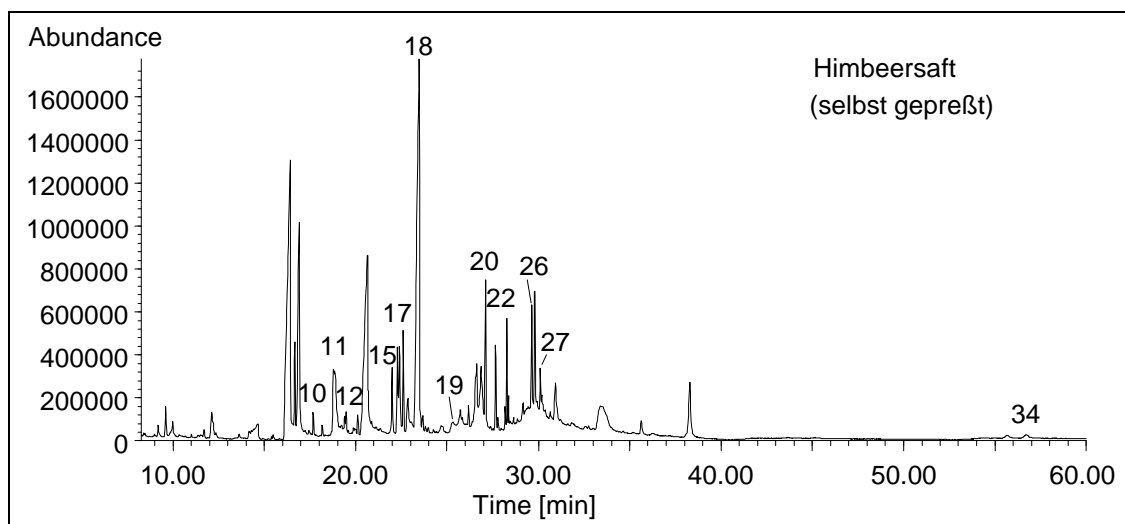
Summenformel: $C_{20}H_{28}O_4N_2$ 

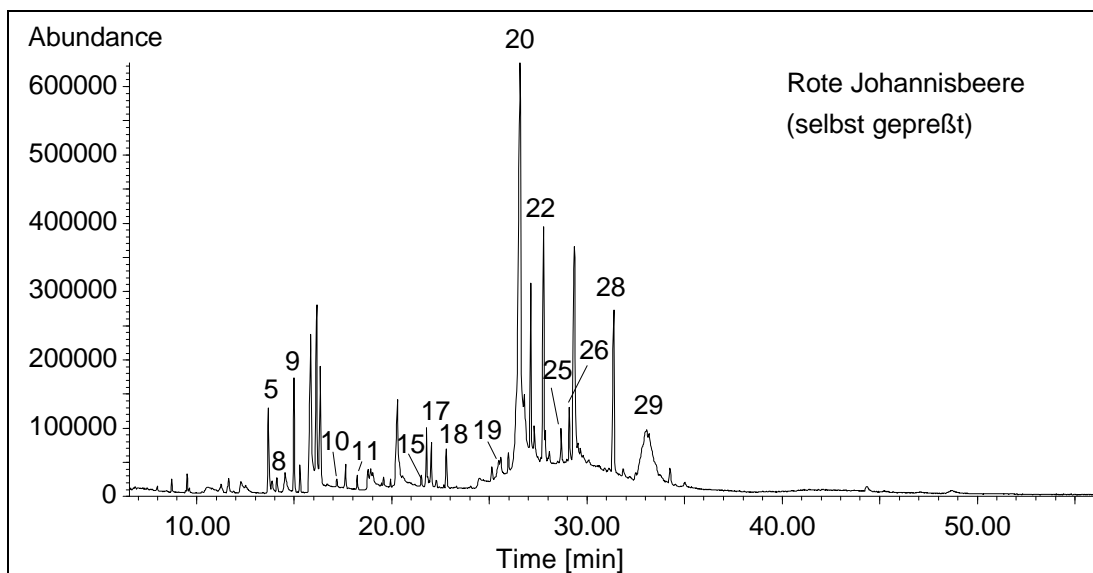
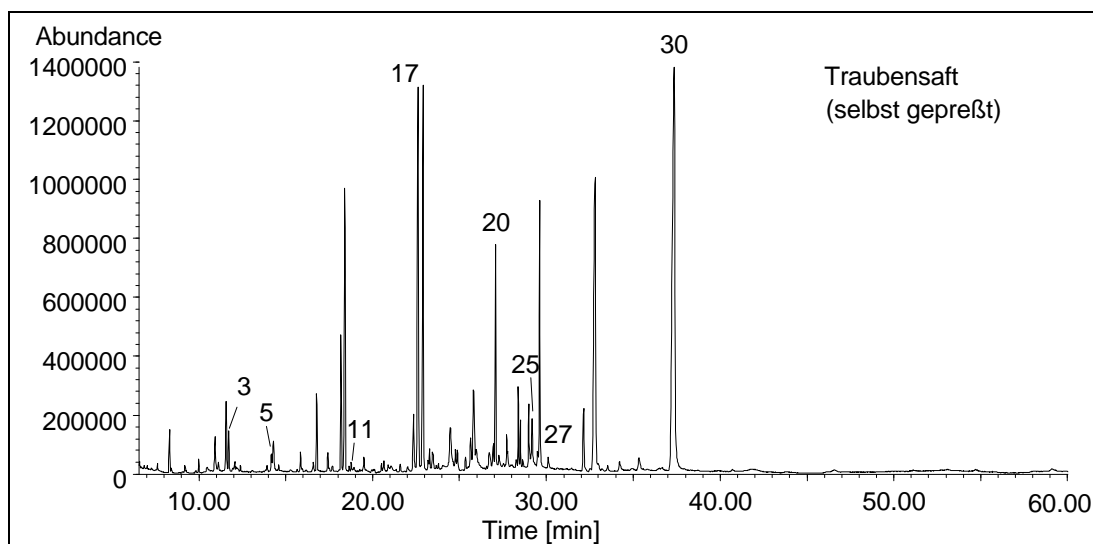
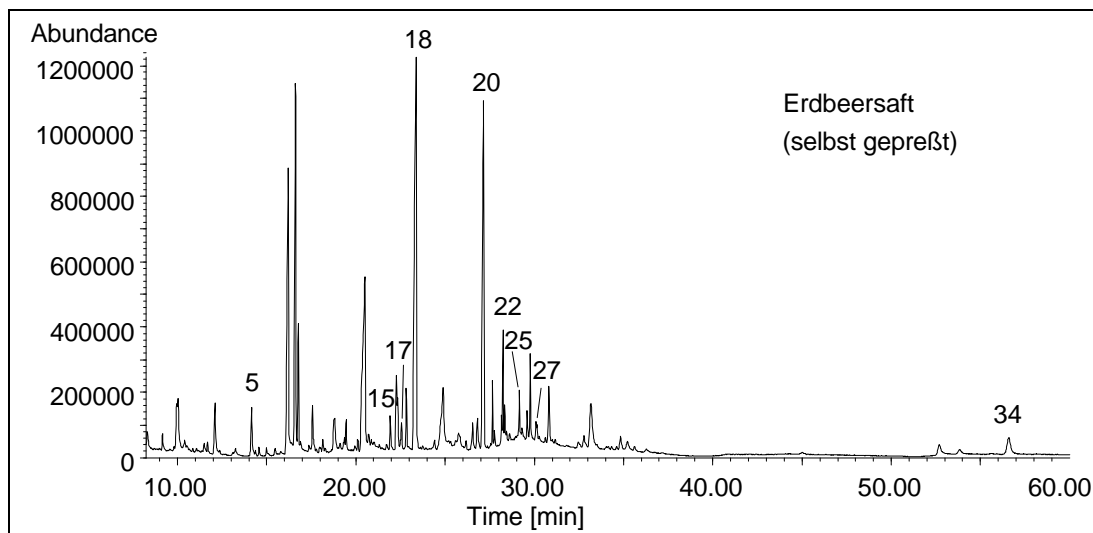
Anhang F: Fingerprints verschiedener Fruchtsäfte

Legende:

1 = Sorbinsäure, 2 = Benzoesäure, 3 = Malonsäure, 4 = Salicylsäure, 5 = Fumarsäure, 6 = Milch- und Glycolsäure, 7 = Bernsteinsäure, 8 = Maleinsäure, 9 = ISTD (Chlorbernsteinsäure), 10 = Glycin, 11 = Valin, 12 = Alanin, 13 = Leucin, 14 = Isoleucin, 15 = Threonin, 16 = γ -Aminobuttersäure, 17 = Prolin, 18 = Asparagin, 19 = Isocitronensäure, 20 = Äpfelsäure, 21 = Methionin, 22 = Citronensäure, 23 = Asparaginsäure, 24 = Stearinsäure, 25 = Phenylalanin, 26 = Serin, 27 = Glutaminsäure, 28 = ISTD (Chlorphenylalanin), 29 = Glutamin, 30 = Weinsäure, 31 = Lysin, 32 = Histidin, 33 = Tyrosin, 34 = Tryptophan

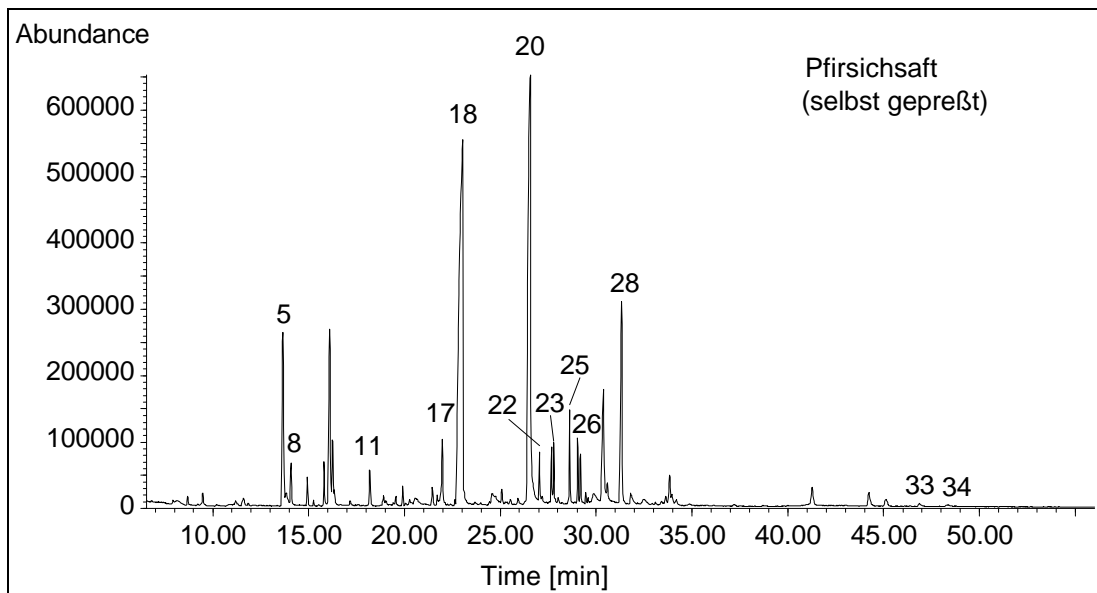
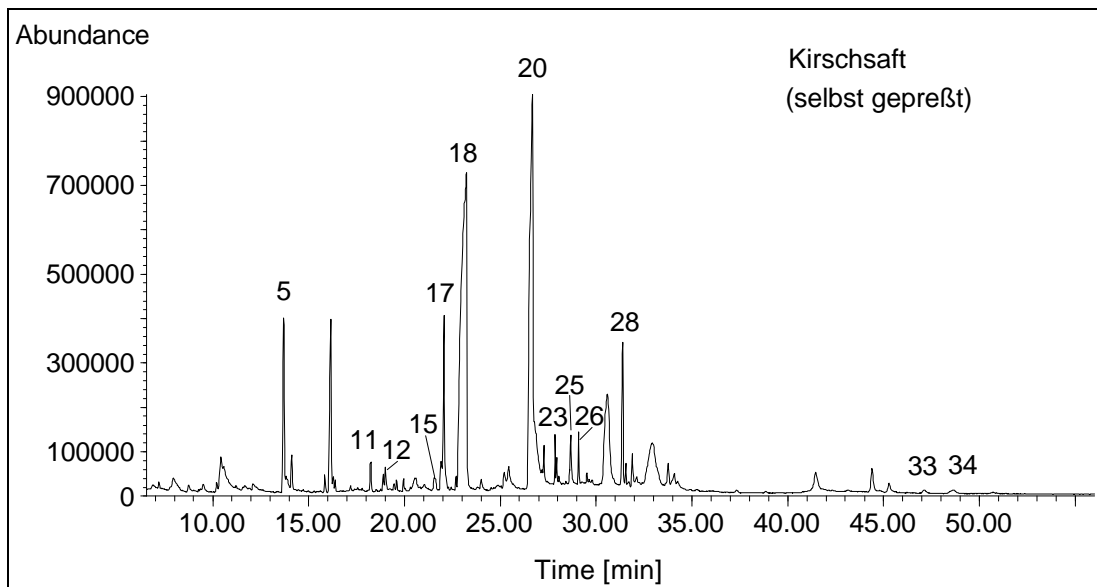
Beerensäfte

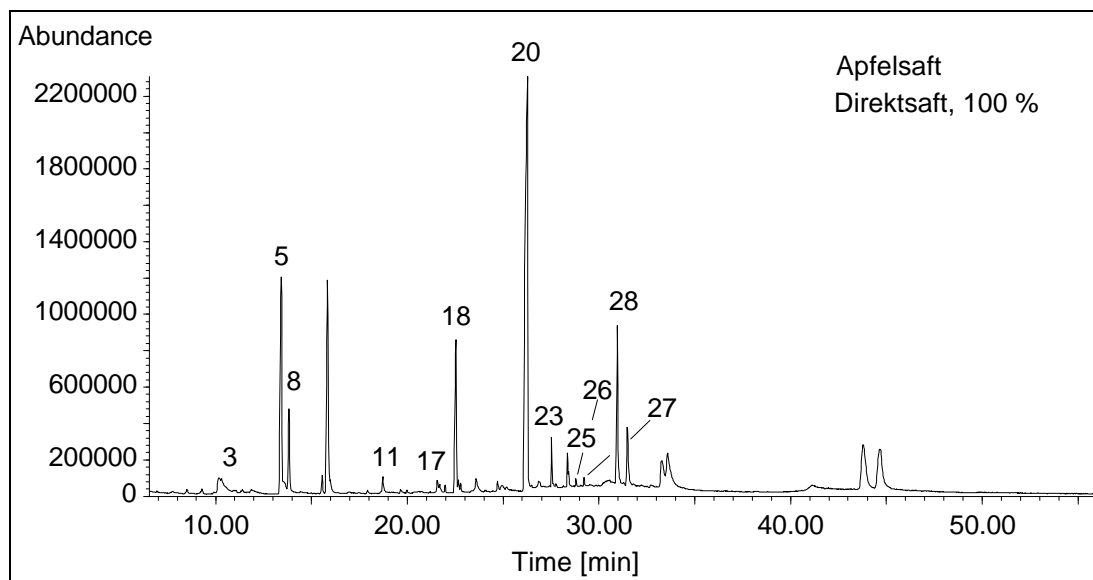
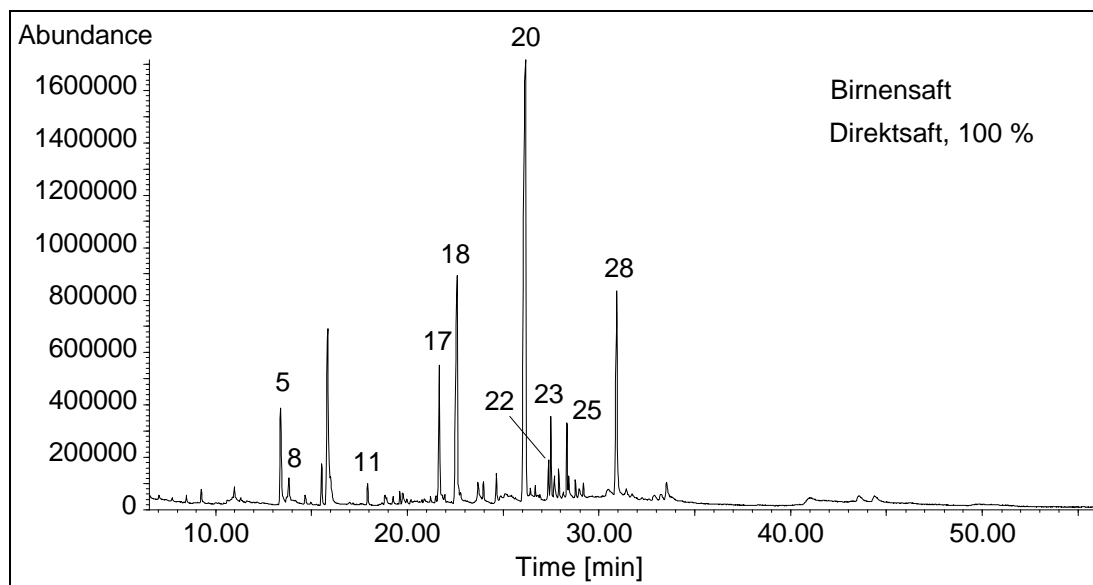


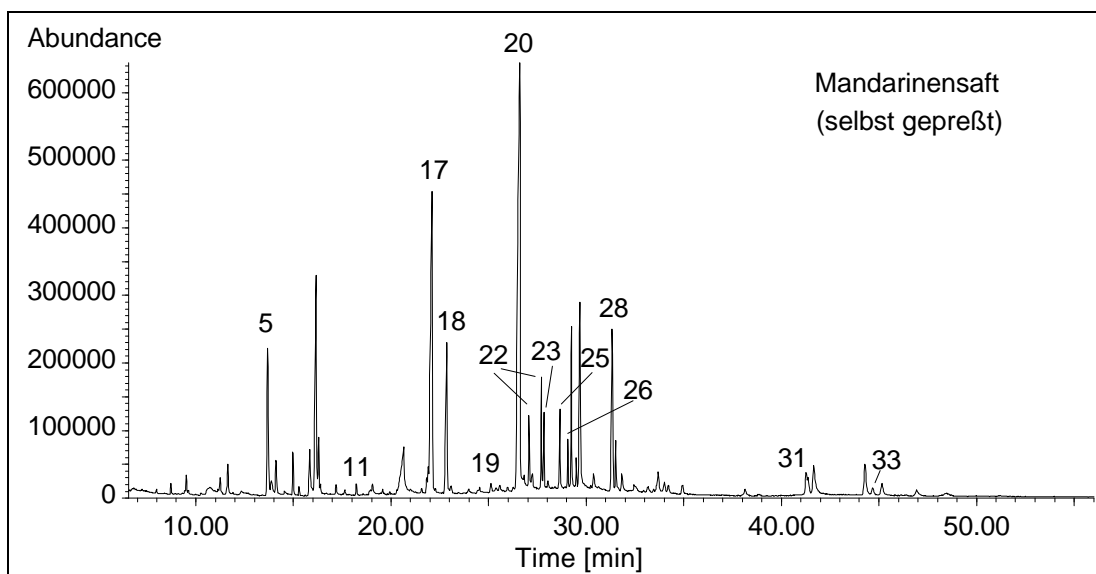
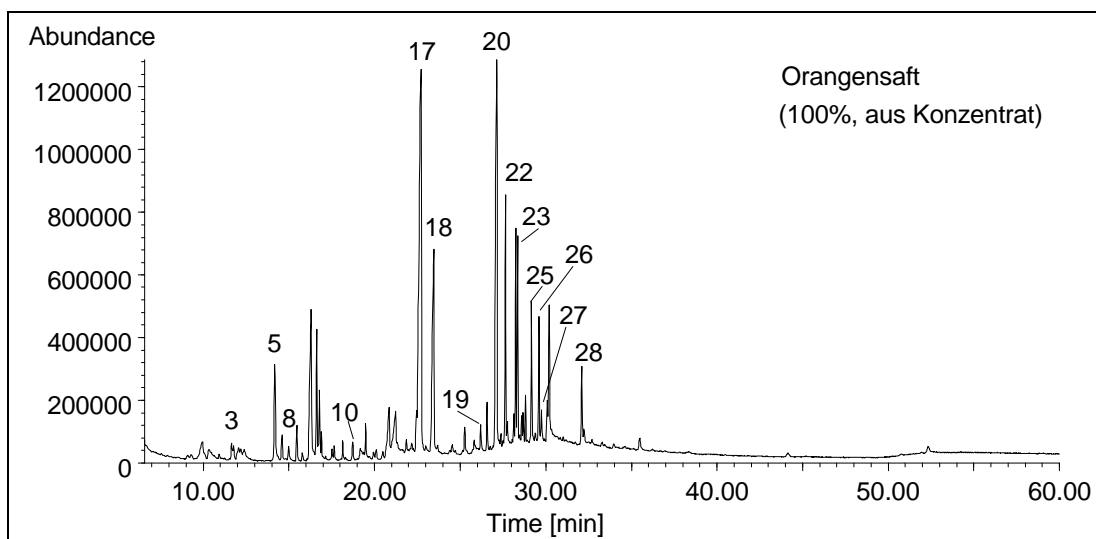
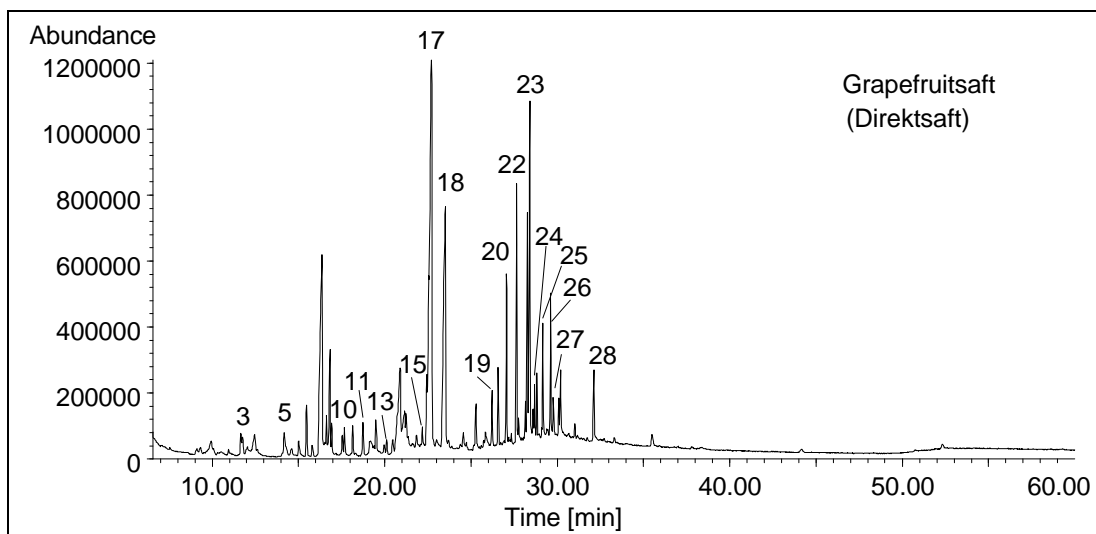
Anhang F: Fingerprints verschiedener Fruchtsäfte**Beerensäfte (Fortsetzung)**

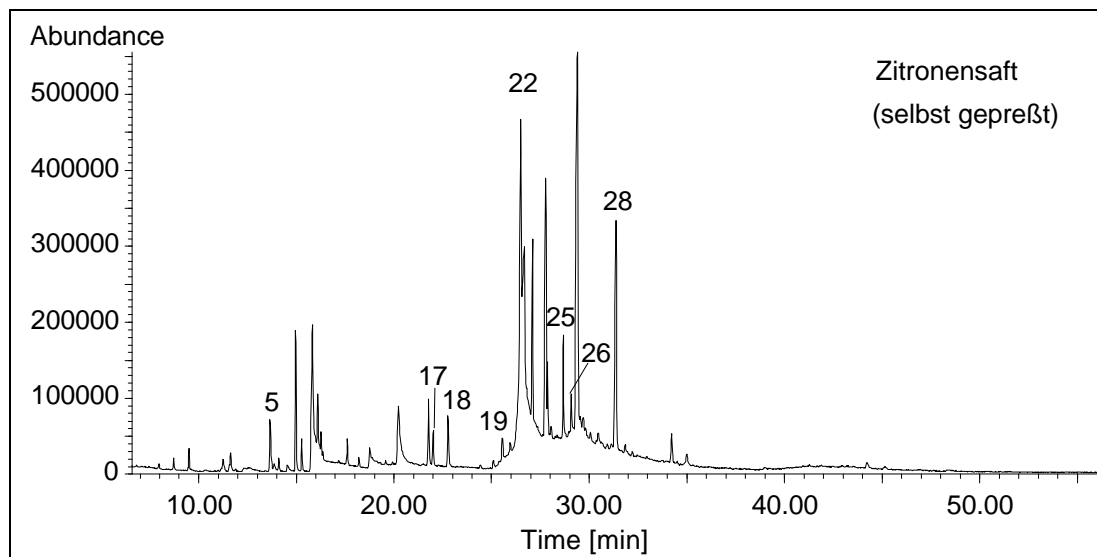
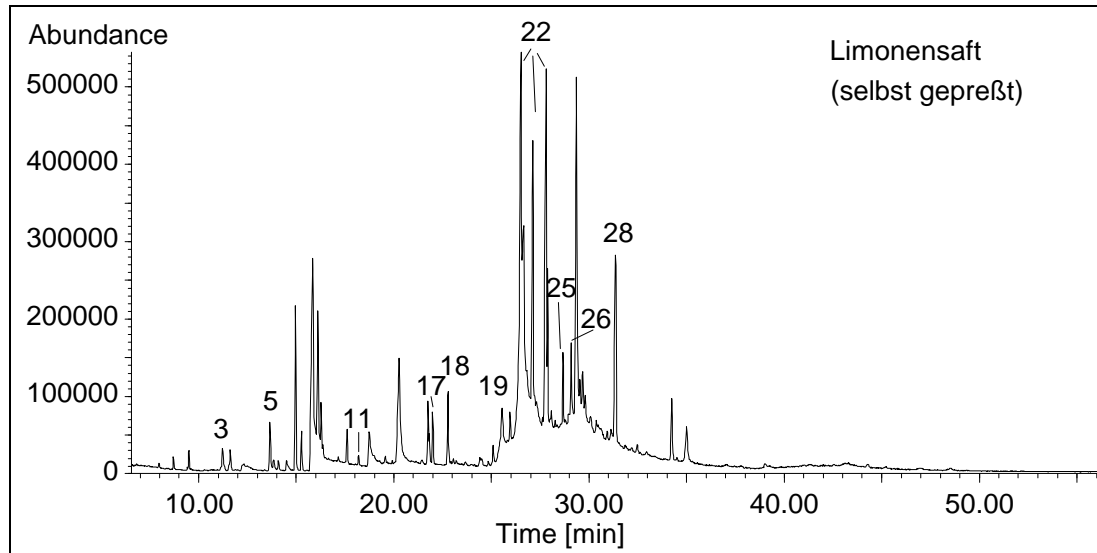
Anhang F: Fingerprints verschiedener Fruchtsäfte

Kern- und Steinobstsäfte



Anhang F: Fingerprints verschiedener Fruchtsäfte**Kern- und Steinobstsäfte (Fortsetzung)**

Anhang F: Fingerprints verschiedener Fruchtsäfte**Citrussäfte**

Anhang F: Fingerprints verschiedener Fruchtsäfte**Citrussäfte (Fortsetzung)**

Anhang G: Probennachweis

Nr.	Fruchtart	Sorte (Name) / Herkunft	Art des Saftes
1	Orange	Navel / Handel	Selbst gepreßt
2	Orange	„Paradiso“ / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
3	Orange	Bauer-Fruchtsaft (Probe 1)/Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
4	Orange	„Klindworth“ / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
5	Orange	Bauer-Fruchtsaft (Probe 2)/Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
6	Orange	Bauer „Brasilia“ / Handel	Direktsaft
7	Orange	Griechenland	Selbst gepreßt
8	Mandarine	Griechenland	Selbst gepreßt
9	Mandarine	Spanien / Handel	Selbst gepreßt
10	Limone	Carlifornien / Handel	Selbst gepreßt
11	Zitrone	Griechenland / Handel	Selbst gepreßt
12	Grapefruit	Fa. Reichelt / Handel	Direktsaft
13	Johannisbeere	Deutschland / Fruchthof	Selbst gepreßt
14	Trauben, weiß	Südafrika / Fruchthof	Selbst gepreßt
15	Erdbeeren	Italien (Probe 1) / Fruchthof	Selbst gepreßt
16	Erdbeeren	Italien (Probe 2) / Fruchthof	Selbst gepreßt
17	Erdbeeren	Belgien / Fruchthof	Selbst gepreßt
18	Himbeeren	Deutschland	Selbst gepreßt
19	Brombeeren	Deutschland	Selbst gepreßt
20	Kirschen	Spanien / Fruchthof	Selbst gepreßt
21	Kirschen	Italien (Probe 1) / Fruchthof	Selbst gepreßt
22	Kirschen	Italien (Probe 2) / Fruchthof	Selbst gepreßt
23	Pfirsich	Spanien (Probe 1) / Fruchthof	Selbst gepreßt
24	Pfirsich	Spanien (Probe 2) / Fruchthof	Selbst gepreßt
25	Birne	Südafrika / Fruchthof	Selbst gepreßt
26	Birne	Lindavia / Handel	Direktsaft, trüb
27	Birne	Lindavia / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
28	Birne	Deutschland	Selbst gepreßt
29	Birne	Deutschland	Selbst gepreßt
30	Birne	Bauer Fruchtsaft / Handel	Direktsaft

Anhang G: Probennachweis

Nr.	Fruchtart	Sorte (Name) / Herkunft	Art des Saftes
31	Birne	Beutelsbacher / Handel	Direktsaft
32	Birne	Bari-Gold / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
33	Birne	Klindworth / Handel	Nektar, mind. 50 % Frucht
34	Birne	Italien (Probe 1) / Fruchthof	Selbst gepreßt
35	Birne	Italien (Probe 2) / Fruchthof	Selbst gepreßt
36	Birne	Italien (Probe 3) / Fruchthof	Selbst gepreßt
37	Apfel	„Red Delicious“ Tirol / Handel	Selbst gepreßt
38	Apfel	„Granny“ Deutschland / Handel	Selbst gepreßt
39	Apfel	„Morgenduft“ Tirol / Handel	Selbst gepreßt
40	Apfel	„Braeburn“ Südafrika / Handel	Selbst gepreßt
41	Apfel	„Golden Delicious“ / Griechenland	Selbst gepreßt
42	Apfel	„Granny“ / Griechenland	Selbst gepreßt
43	Apfel	„Jona Gold“ / Griechenland	Selbst gepreßt
44	Apfel	Havelobst / Handel	Selbst gepreßt
45	Apfel	„Carola“ Havelobst / Handel	Selbst gepreßt
46	Apfel	„Augustapfel“ / Deutschland	Selbst gepreßt
47	Apfel	„beckers bester“ / Handel	Naturtrüb, 100 %-Saft
48	Apfel	„Apfelblüte“ (Probe 1) / Handel	Naturtrüb, 100 %-Saft
49	Apfel	„Apfelblüte“ (Probe 2) / Handel	Naturtrüb, 100 %-Saft
50	Apfel	„Apfelblüte“ (Probe 3) / Handel	Naturtrüb, 100 %-Saft
51	Apfel	„Dittmeyers Valensina“ / Handel	Naturtrüb, 100 %-Saft
52	Apfel	„Evita“ / Handel	Naturtrüb, 100 %-Saft
53	Apfel	„Hohes C“ / Handel	Naturtrüb, 100 %-Saft
54	Apfel	„Beckers“ / Handel	Naturtrüb, 100 %-Saft
55	Apfel	„Klindworth“ / Handel	Direktsaft
56	Apfel	„Bauer“ / Handel	Direktsaft
57	Apfel	„Hitchcock“ / Handel	Direktsaft
58	Apfel	„Berling´s Naturkost“ / Handel	Direktsaft
59	Apfel	„Golden Delicious“ Mövenpick	Direktsaft, sortenrein
60	Apfel	„Herbstgold“ Libehna / Handel	Direktsaft

Anhang G: Probennachweis

Nr.	Fruchtart	Sorte (Name) / Herkunft	Art des Saftes
61	Apfel	„Werder-Saft“ / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
62	Apfel	„Wesergold“ (Probe 1) / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
63	Apfel	„Wesergold“ (Probe 2) / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
64	Apfel	„Libehna“ / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
65	Apfel	„Beckers“ / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
66	Apfel	„riha“ Hartinger / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
67	Apfel	„Fruchtgarten“ / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
68	Apfel	„albi- Unser Bester“ / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
69	Apfel	„Libehna“ / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
70	Apfel	„albi-Gold Apfel“ / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
71	Apfel	„Bauer“ (Probe 1) / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
72	Apfel	„Bauer“ (Probe 2) / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
73	Apfel	„Euro-Shopper“ / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
74	Apfel	Fa. Reichelt-Saft / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
75	Apfel	„beckers bester“ / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
76	Apfel	Fa. Wilke Stahnsdorf	100 %-Saft aus Konzentrat
77	Apfel	„Albis bester“ / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
78	Apfel	„albi-unser bester“ / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
79	Apfel	„Wesergold“ riha, Hartinger	100 %-Saft aus Konzentrat
80	Apfel	„Evita“ / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
81	Apfel	Fruchthof Sachsen-Land / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
82	Apfel	Lockwitzgrund, Sachsen / Handel	100 %-Saft aus Konzentrat
83	Apfel	„Euro-Shopper“ / Handel	30 % Fruchtgehalt, mit Säuerungsmittel Citronen- säure

